



Paula Sofia Costa Martins

Licenciatura em Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de Nanopartículas de Hidroxiapatite dopada com Ferro para Hipertermia Magnética

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor João Paulo Borges, DCM – FCT/UNL

Coorientadora: Doutora Paula Isabel Pereira Soares, DCM – FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017

Desenvolvimento de Nanopartículas de Hidroxiapatite dopada com Ferro para Hipertermia Magnética

Copyright © Paula Sofia Costa Martins, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“Não há nada que seja maior evidência de insanidade, do que fazer a mesma coisa dia após dia e esperar resultados diferentes.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Após vários meses de realização deste projeto, que abrangem o trabalho de laboratório, repetição de procedimentos, trabalhos inconclusivos, pesquisa e investigação e escrita da dissertação, há muita gente a quem é necessário agradecer por terem tornado esta etapa exequível.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Prof. Doutor João Paulo Borges pela ajuda e paciência demonstradas, tendo sempre uma palavra positiva e calmante nas situações mais stressantes em que os resultados não eram os mais promissores.

À minha coorientadora Doutora Paula Soares por todo o apoio e compreensão transmitidos, assim como pelas dicas e informações imprescindíveis acerca da execução da presente dissertação. Agradeço também pelo incentivo de trabalho através das reuniões bissemanais, o que facultou uma dedicação constante da minha parte para a obtenção de resultados.

Ao Prof. Jorge Silva, o meu obrigada pela disponibilidade, cooperação e paciência demonstradas aquando a realização dos ensaios de citotoxicidade às amostras no Departamento de Física.

À Prof. Joana Pinto pela ajuda a manusear o *software High Score Plus* presente no CENIMAT, assim como, por toda a curiosidade e prontidão que fez transparecer na análise dos espectros de difração de raios-X.

Agradeço aos meus colegas de laboratório – Ricardo Matos (o meu amigo que durante tantas horas, dia após dia, me aturou sempre e com boa disposição), Catarina Chaparro (que me ensinou todos os procedimentos básicos de laboratório), Miguel Baptista, Adriano Brás e Renato Martins – o meu muito obrigada por toda a partilha e apoio demonstrados ao longo dos seis meses.

À minha família por todo o apoio e preocupação. Aos meus pais pela motivação e confiança que depositam em mim, por me darem mais do que aquilo que poderia querer, obrigada! À minha irmã e ao Capitolino, meus colegas de casa e companheiros, que tanto me facilitaram esta jornada.

Agradeço ainda à minha prima Rita Gil por estar desde sempre para sempre a meu lado! E à Maria Moradas, Carolina Gonçalves e André Castilho por toda a amizade e apoio durante todo este percurso académico, assim como à Mariana Sequeira e Francisca Fonseca. Obrigada também ao *liceunation* por serem uma inspiração e um poço de aprendizagem.

Por fim, mas não menos importante, aos amigos que a FCT me deu, ao Gonçalo Luís, à Mariana Cândido, à Tânia Liu, ao Nuno Fernandes, David Melo e Miguel Baptista, obrigada por todos os dias e noites a escrever a dissertação e por toda a motivação que me deram. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil. Sem esquecer a Catarina Pinheiro que me acompanhou durante os cinco anos de curso, obrigada por tudo!

Resumo

O cancro é uma doença alvo de inúmeros estudos por parte da comunidade científica que visam o seu diagnóstico precoce e um tratamento eficiente. Um complemento eficaz é o tratamento do tumor, neste caso, ósseo, através de hipertermia magnética.

Como a composição química e mineral da hidroxiapatite (HAp) se assemelha bastante ao componente mineral do osso, este é um potencial candidato para a cirurgia de reparação óssea, e a sua dopagem pode ser vantajosamente usada para melhorar o seu comportamento biológico.

Posto isto, a presente dissertação visa desenvolver e caracterizar nanopartículas de HAp pura e com diferentes quantidades de iões ferro (Fe^{3+}) incorporadas, com aplicabilidade em hipertermia magnética e regeneração óssea. A fórmula química das amostras pretendidas é $(\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com $x = 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5 , e o método de síntese é um processo simples denominado sol-gel com sinterização a 600°C , 700°C e 800°C . Neste estudo as partículas sintetizadas de tamanho nanométrico são caracterizadas por diversas técnicas com o intuito de avaliar o efeito da temperatura de sinterização e do mecanismo de dopagem na estrutura da HAp. Além disso, são analisadas as propriedades magnéticas e a resposta térmica destas partículas e é provado o seu comportamento não-citotóxico através de testes de viabilidade celular.

As análises de difração de raios-X (DRX) e de espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) revelam que as nanopartículas desenvolvidas possuem um limite de solubilidade de $x = 1$, pois acima desta quantidade de Fe na estrutura da HAp há a deteção de fases secundárias. O que sugere que apenas existe dopagem da rede cristalina para $x \leq 1$. Além disso, os ensaios de hipertermia magnética realizados indicam que as quantidades de Fe incorporadas na estrutura da HAp não são suficientes para gerar a temperatura necessária à redução do tumor ósseo. No entanto, as partículas mostraram grande potencialidade na medida em que apresentam um comportamento superparamagnético, tal como pretendido.

Palavras-chave: Hidroxiapatite, Hipertermia Magnética, Dopagem da Rede, Nanopartículas Magnéticas, Reparação Óssea.

Abstract

Cancer is a disease that has been the subject of numerous studies by the scientific community aimed at a prior diagnosis and an efficient treatment. An effective complement to the treatment of the tumor, in this case, bone tumor, is the magnetic hyperthermia.

Because chemical and mineral composition of hydroxyapatite (HAp) closely resembles the mineral component of bone, it is a potential candidate for bone repair surgery, and its doping may be advantageously used to improve its biological behavior.

Thus, the present dissertation aims to develop and characterize nanoparticles of pure HAp and with different amounts of iron ions (Fe^{3+}) incorporated, with application in magnetic hyperthermia and bone regeneration. The chemical formula of the desired samples is $(\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, with $x = 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3$ and 5 , and the synthesis method is a simple process called sol-gel with sintering at 600°C , 700°C and 800°C . In this study, synthesized nanoparticles are characterized by various techniques to evaluate the effect of temperature sintering and the doping mechanism in the HAp structure. In addition, the magnetic properties and the thermal response of these particles are analyzed and their non-cytotoxic behavior is tested by cell viability tests.

X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyzes reveal that the developed nanoparticles have a solubility limit of $x = 1$, since above the amount of Fe in the structure of HAp there is a detection of secondary phases. This suggests that there is only doping of the crystal lattice for $x \leq 1$. In addition, the magnetic hyperthermia assays performed conclude that the amounts of Fe incorporated into the structure of the HAp are not sufficient to generate the temperature necessary for the reduction of the bone tumor. However, the particles showed great potentiality because they exhibit a superparamagnetic behavior as planned.

Keywords: Hydroxyapatite, Magnetic Hyperthermia, Lattice Doping, Magnetic Nanoparticles, Bone Repair.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE.....	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XVII
ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS	XIX
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	3
2.1. HIDROXIAPATITE	3
2.2. Síntese de Hidroxiapatite.....	5
2.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	8
2.3.1. Conceitos básicos de magnetismo.....	9
2.4. HIPERtermia Magnética.....	11
2.5. ESTADO DA ARTE: DOPAGEM DE HAP COM FERRO	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. SÍNTESE DE HIDROXIAPATITE.....	17
3.1.1. Materiais	17
3.1.2. Método experimental	17
3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	18
3.2.1. Difração de raios-X.....	19
3.2.2. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier	20
3.2.3. Análise térmica diferencial e termogravimétrica	20
3.2.4. Magnetometria de amostra vibrante.....	20
3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão.....	21
3.3. ENSAIOS DE HIPERtermia Magnética.....	21
3.3.1. Materiais	21
3.3.2. Método experimental	21
3.4. TESTES DE BIOATIVIDADE.....	22

3.4.1.	Materiais	22
3.4.2.	Método experimental	22
3.5.	TESTES DE CITOTOXICIDADE.....	23
3.5.1.	Materiais	23
3.5.2.	Método experimental	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1.	CARACTERIZAÇÃO.....	27
4.1.1.	Difração de raios-X.....	27
4.1.2.	Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier	35
4.1.3.	Análise térmica diferencial e termogravimétrica	37
4.1.4.	Magnetometria de amostra vibrante.....	38
4.1.5.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	40
4.2.	HIPERTERMIA MAGNÉTICA.....	41
4.3.	BIOATIVIDADE.....	42
4.4.	CITOTOXICIDADE	43
5.	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
A.	APÊNDICES	51
A.1.	PARÂMETROS DE REDE	51
A.2.	MAGNETÓMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE	52

Lista de Figuras

- Figura 2.1: Projeção do eixo c da célula unitária de hidroxiapatite ($P6_3/m$). Os átomos de Ca(1) são mostrados a azul e os de Ca(2) a roxo. Os tetraedros de fosfato (PO_4^{3-}) são mostrados a verde com o átomo de fósforo (P) no centro dos átomos do tetraedro. Os átomos de oxigênio O(1) (laranja) e O(2) (cinza) estão no plano do espelho e dois O(3) (vermelho) acima e abaixo do plano do espelho. O ião OH^- (O amarelado e H prateado) ocupa o canal central do hexágono [14]..... 4
- Figura 2.2: Estrutura hierárquica dos ossos a várias escalas de comprimento. A microestrutura do osso compacto consiste no sistema Haversiano (círculos em secção cruzada em vista microscópica) com canais osteónicos e lamelas. À nanoescala o sistema estrutural possui fibras de colagénio compostas por conjuntos de fibrilas mineralizadas de colagénio e hidroxiapatite. (Adaptado de [13])..... 5
- Figura 2.3: Representação esquemática das diferentes etapas e direções do processo sol-gel. (Adaptado de [27])..... 8
- Figura 2.4: Magnetização (ZFC/FC) em função da temperatura de um conjunto de nanopartículas magnéticas. Curvas de magnetização características em função do campo magnético no estado bloqueado ($T < T_B$), superparamagnético ($T_B < T < T_C$) e paramagnético ($T > T_C$). (Adaptado de [31])..... 10
- Figura 2.5: Representação da configuração dos domínios magnéticos em materiais com diferentes tamanhos. A - Estado desmagnetizado em materiais ferromagnéticos. B - Remoção de paredes de domínios. C - Único monodomínio magnético com propriedades superparamagnéticas [31]...... 11
- Figura 3.1: Fluxograma da síntese de nanopartículas de HAp pura via sol-gel. (Adaptado de [23]). 18
- Figura 4.1: Comparação visual entre os pós de HAp pura (A) e com quantidades de Fe^{3+} incorporadas iguais a $x = 0,25$ (B), $x = 0,5$ (C), $x = 1$ (D), $x = 2$ (E), $x = 3$ (F) e $x = 5$ (G), sinterizados a $700^\circ C$ durante 1 h. 27
- Figura 4.2: Comparação entre o espectro de difração de raios-X da HAp pura ($x = 0$) sinterizada a $600^\circ C$ (A) e os principais picos de difração referentes à HAp retirados da ficha JCPDS #09-0432 (B). 28

Figura 4.3: Comparação entre os espectros de difração de raios-X da HAp pura ($x = 0$) e dopada com diferentes quantidades de Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), sinterizada a 600°C (A), 700°C (B) e 800°C (C) durante 1h.	29
Figura 4.4: Localização geométrica da substituição por Fe^{3+} no sítio Ca(1). Os átomos vizinhos mais próximos são três O(1) (laranja) e um O(2) (cinza). As linhas tracejadas marcam as ligações quebradas [14].	34
Figura 4.5: Evolução dos parâmetros de rede a (A) e c (B) das amostras de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5$ e 1) sinterizada a 600°C , 700°C e 800°C durante 1h.	35
Figura 4.6: Espectros de FTIR das partículas de HAp pura ($x = 0$) e com diferentes quantidades de Fe^{3+} ($x = 0,5, 2, 3$ e 5) sinterizadas a 600°C (A e D), 700°C (B) e 800°C (C) durante 1 h.	36
Figura 4.7: Curvas de TGA (A) e DTA (B) das partículas de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe^{3+} ($x = 0; 0,25; 0,5; 1$).	37
Figura 4.8: Curvas de magnetização das amostras de HAp com Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5) sinterizadas a 700°C , em função do campo magnético, medidas à temperatura de 7 K ($T < T_B$) (A) e de 300 K ($T_B < T < T_C$) (B).	39
Figura 4.9: Imagens obtidas por TEM da amostra de HAp dopada com $x = 0,5$ (A e B) e da amostra de HAp com $x = 2$ (C e D), sinterizadas a 700°C	41
Figura 4.10: Aumento de temperatura gerado pelas partículas produzidas de HAp durante 10 minutos de aplicação de um campo magnético alternado com 24 kA.m^{-1} de intensidade e $418,5\text{ kHz}$ de frequência em função da quantidade de ferro inserida na estrutura de HAp ($x = 0, 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5).	42
Figura 4.11: Viabilidade celular, em %, de células Vero após contato com as sete amostras de HAp produzidas ($x = 0, 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), e respetivo desvio padrão, em comparação com as células de controlo (C).	44
Figura A.1: Curvas de magnetização das amostras com $x = 0,25$ (A), $x = 0,5$ (B), $x = 1$ (C), $x = 2$ (D),	52

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Breve descrição de diferentes métodos de preparação de nano hidroxiapatite	6
Tabela 3.1: Quantidade de massa (em gramas) de cada precursor, dependendo da quantidade atômica de ferro (x nominal) ou percentagem molar de ferro	18
Tabela 4.1: Compostos químicos presentes nas amostras com x=2, 3 e 5, sinterizadas a 600°C, 700°C e 800°C	30
Tabela 4.2: Valor do diâmetro de cristalito associado a cada amostra de HAp pura (x = 0) e dopada com Fe (x = 0,25; 0,5 e 1) para cada temperatura de sinterização.....	32
Tabela 4.3: Percentagem de cristalinidade das amostras de HAp pura (x = 0) e dopada com Fe (x = 0,25; 0,5 e 1) para cada temperatura de sinterização.....	33
Tabela 4.4: Temperatura dos picos derivativos e perdas de massa das amostras de HAp pura e dopada com Fe ³⁺ (x = 0; 0,25; 0,5 e 1)	38
Tabela A.1: Parâmetros de rede a e c das amostras de HAp pura (x = 0) e dopada com Fe ³⁺ (x = 0,25; 0,5 e 1) para cada temperatura de sinterização	51

Acrónimos e Símbolos

AFM	Antiferromagnético
Ca	Cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CaPO ₄	Fosfato de cálcio
CDP	Difosfato de cálcio
CSM	Câmara de segurança máxima
D _c	Diâmetro de cristalito
DM	Diamagnético
DO	Densidade ótica
DRX	Difração de raios-X
DTA	Análise térmica diferencial
FC	<i>Field cooling</i>
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Fe	Ferro
Fe ³⁺	Ião de ferro
Fe ₂ O ₃	Óxido de ferro, hematite
FM	Ferromagnético
FTIR	Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
h	Horas
<i>H</i>	Intensidade do campo magnético
HAp	Hidroxiapatite
<i>H_c</i>	Campo coercivo ou coercividade
ICDD	International Centre for Diffraction Data®
IV	Infravermelho

JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
M	Magnetização
M_R	Magnetização remanescente
M_{sat}	Magnetização de saturação
NPMs	Nanopartículas magnéticas
NPs	Nanopartículas
P	Fósforo
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PDF	<i>Powder Diffraction File</i> TM
PM	Paramagnético
PVA	Acetato de polivinila
SBF	Solução simuladora do fluido corporal
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
SPM	Superparamagnético
T	Temperatura
T_B	Temperatura de bloqueio
T_C	Temperatura de Currie
TCP	Fosfato de tricálcio
β -TCP	Fase polimórfica do TCP
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão
T_N	Temperatura de Néel
TTCP	Fosfato de tetracálcio
VSM	Magnetómetro de amostra vibrante
x	Quantidade atómica de Fe^{3+} inserida na estrutura de HAp
X	Suscetibilidade magnética
X_c	Grau de cristalinidade
ZFC	<i>Zero field cooling</i>

μ	Momento de dipolo magnético efetivo
μ_{at}	Momento de dipolo magnético atômico
ν	Modo de vibração com deformação axial
δ	Modo de vibração com deformação angular
λ	Comprimento de onda



1. Contextualização

O cancro é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células malignas capazes de se espalharem pelo corpo e danificar o tecido saudável. Milhões de pessoas sofrem de cancro em todo o mundo, por isso, este é um assunto alvo de inúmeros estudos por parte da comunidade científica que visam o seu diagnóstico precoce e um tratamento eficaz.

Segundo as previsões anunciadas pelo Centro Estatístico de Cancro Americano [1], até ao final do ano de 2017 haverá cerca de 3260 novos casos de cancro dos ossos e articulações e são esperadas cerca de 1550 mortes provocadas por este tipo de cancro, apenas nos Estados Unidos.

O osso é a estrutura de apoio do corpo humano. Qualquer tipo de células deste tecido pode desenvolver tumores ósseos malignos, isto é, células cancerígenas, denominando-se cancro primário. Além disso, as células cancerígenas podem desprender-se do tumor primário e invadir outros tecidos de diferentes partes do corpo, sendo o osso um dos locais mais atingidos [2]. Este processo ocorre através de metástases, quando as células cancerígenas se deslocam pelo sistema linfático ou pela corrente sanguínea, formando novos tumores noutros órgãos.

As opções de tratamento dependem de diversos fatores como o estágio do cancro ósseo, a sua localização e tamanho e as condições gerais de saúde do paciente. Atualmente, os métodos de terapia mais utilizados incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Estes tratamentos são bastante invasivos e exigem muito esforço e sofrimento por parte do paciente, conduzindo a uma diminuição da sua qualidade de vida.

Posto isto, estão a ser estudadas novas formas de prevenir, detetar e tratar o cancro. Um complemento eficaz é o tratamento do tumor através de hipertermia magnética que pos-

sibilita a morte das células cancerígenas através da geração de calor por parte de nanopartículas magnéticas (NPMs). Este aquecimento ocorre quando as nanopartículas são submetidas a um campo magnético externo alternado [3]. Para isso, é necessário que as NPMs, além de biocompatíveis, possuam propriedades exclusivas de superparamagnetismo, sendo as nanopartículas de óxido de ferro, em específico de magnetite, as eleitas para ensaios de hipertermia magnética [4][5][6].

Além de eliminar o tumor maligno, é possível desenvolver partículas com a capacidade de regenerar o tecido ósseo através da presença de hidroxiapatite (HAp) [7]. Este fosfato de cálcio está inserido na parte mineral do osso humano, apresentando propriedades de bioatividade, osteocondução e osteoindução [8][9][10].

A presente dissertação visa desenvolver e caracterizar nanopartículas de hidroxiapatite pura e dopada com diferentes quantidades de íons Fe^{3+} , com aplicabilidade em hipertermia magnética. Neste estudo, o método de síntese destes compostos é um processo simples denominado sol-gel.

Esta investigação está inserida na área de engenharia de tecidos e biomateriais, tendo sido realizada nas instalações do Departamento de Ciência dos Materiais da FCT-UNL.

O conteúdo desta dissertação está organizado em cinco capítulos principais. Após a Contextualização, encontra-se o Enquadramento Teórico, onde são descritas as propriedades da hidroxiapatite, como esta pode ser sintetizada, uma breve descrição sobre as propriedades magnéticas que tornam as nanopartículas aplicáveis em hipertermia magnética, e, ainda, o estado da arte do presente tema. Em terceiro lugar, são descritos os Materiais e Métodos usados na síntese e caracterização das amostras de hidroxiapatite pura e dopada com ferro, assim como nos testes de hipertermia magnética, bioatividade e citotoxicidade. Seguidamente, os Resultados e Discussão são apresentados no capítulo 4, a partir dos quais são retiradas algumas Conclusões e Trabalho Futuro a desenvolver.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Hidroxiapatite

A Hidroxiapatite (HAp) é um mineral cristalino do grupo dos ortofosfatos de cálcio, pertencente à família das apatites ($A_{10}(BO_4)_6X_2$), apresentando a fórmula química: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ($A = Ca$, $B = P$ e $X = OH$). Possui uma razão molar entre cálcio e fosfato (Ca/P) igual a 1,67, densidade igual a $3,16 \text{ g.cm}^{-3}$ e um pH estável em solução aquosa a 25°C entre 9,5 e 12. A HAp cristaliza com uma fase monoclinica, contudo, a temperaturas superiores a $\sim 250^\circ\text{C}$, dá-se uma transição da fase para hexagonal [8].

A fase hexagonal da HAp raramente é estequiométrica ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), pois a sua composição é facilmente modificada com a inserção de outros iões permitindo uma ampla variedade de substituições. Os iões mais recorrentemente incorporados na HAp biológica são o carbonato (CO_3^{2-}), podendo também existir a incorporação de flúor (F^-), cloro (Cl^-), potássio (K^+), ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), e outros elementos [11].

O fosfato de cálcio ($CaPO_4$) é o principal constituinte da maioria dos tecidos calcificados de todos os mamíferos. Em particular, o osso é constituído por $\sim 60\text{-}70 \text{ \% (m/m)}$ de $CaPO_4$, $\sim 20\text{-}30 \text{ \% (m/m)}$ de colagénio e mais de 10 \% (m/m) de água [8]. Como tal os fosfatos de cálcio são os materiais de eleição para reparação óssea [12]. A hidroxiapatite é o biomaterial baseado em fosfato de cálcio mais frequentemente utilizado devido às suas propriedades químicas e estruturais serem muito semelhantes aos componentes minerais dos ossos e dentes humanos. Por conseguinte, a HAp é bastante usada como revestimento ortopédico e em implantes dentários com crescente interesse por parte da comunidade científica, tendo havido um aumento do número de artigos publicados nos últimos anos referentes à hidroxiapatite [13].

As principais vantagens da hidroxiapatite sintética são a sua biocompatibilidade, não apresentando toxicidade, lenta biodegradabilidade *in situ*, e as suas capacidades de osteocondução e osteoindução. No entanto, a HAp não possui força mecânica suficiente para envolver aplicações de grande carga por muito tempo [8].

A célula unitária deste biocerâmico pertence ao sistema hexagonal com grupo espacial $P6_3/m$ e apresenta como parâmetros de rede $a = b = 9,422 \text{ \AA}$ e $c = 6,880 \text{ \AA}$. A estrutura cristalina da HAp consiste numa rede de dimensões nanométricas de iões hidroxilo (OH^-) localizados no centro de triângulos de iões cálcio (Ca^{2+}) alinhados em colunas paralelas ao eixo c , juntamente com iões Ca^{2+} e iões fosfato (PO_4^{3-}) (Figura 2.1). Os iões cálcio ocupam dois sítios cristalográficos não-equivalentes. No sítio Ca(1) (azul) situam-se seis iões que ocupam o local 4f e cada um está rodeado por seis tetraedros de fosfato. Os átomos de Ca(2) (roxo) no plano do espelho ocupam o local 6h em torno do canal central do hexágono, paralelo ao eixo c [14][15][16].

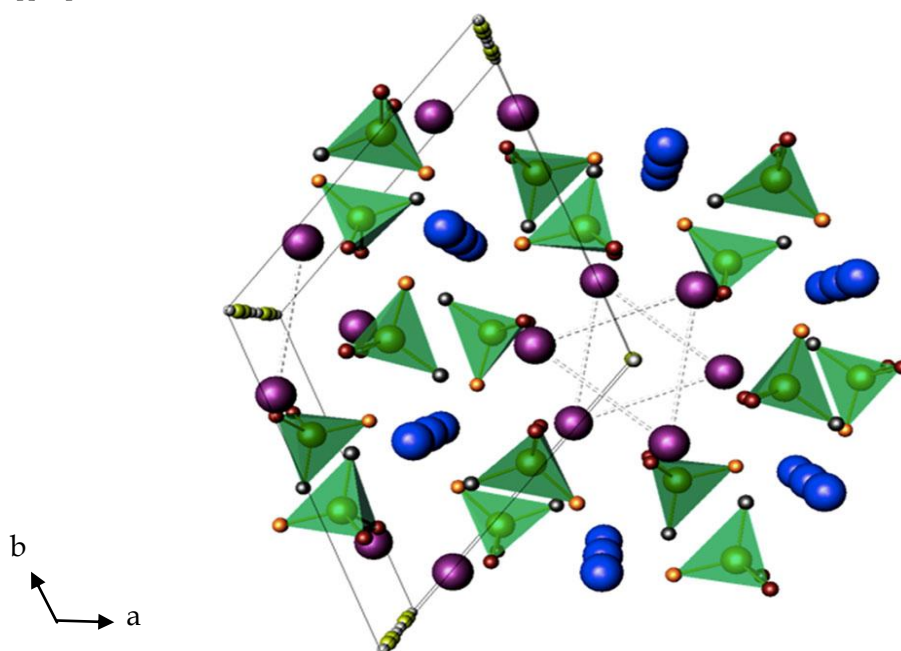


Figura 2.1: Projeção do eixo c da célula unitária de hidroxiapatite ($P6_3/m$). Os átomos de Ca(1) são mostrados a azul e os de Ca(2) a roxo. Os tetraedros de fosfato (PO_4^{3-}) são mostrados a verde com o átomo de fósforo (P) no centro dos átomos do tetraedro. Os átomos de oxigênio O(1) (laranja) e O(2) (cinza) estão no plano do espelho e dois O(3) (vermelho) acima e abaixo do plano do espelho. O ião OH^- (O amarelado e H prateado) ocupa o canal central do hexágono [14].

Atualmente, a nanoescala, isto é, dimensões inferiores a 100 nm, tem sido cada vez mais utilizada em medicina e engenharia de tecidos [17]. Este facto deve-se à elevada razão entre área de superfície e volume, aproximando-se em tamanho e composição química ao tecido ósseo humano. À nanoescala é possível manipular a matéria a nível atómico e molecular e aperfeiçoar a estabilidade mecânica da armação óssea, facultando uma superfície química mais apropriada e uma porosidade adequada para a proliferação celular, sem esquecer as propriedades de biocompatibilidade [13][18].

Posto isto, a nano-hidroxiapatite é largamente aplicada em substituição óssea e na regeneração deste tecido, pois a osteointegração dos implantes é facilitada. Na Figura 2.2 está

projetada a composição óssea onde se observam os cristais de HAp incluídos na estrutura do osso à escala nanométrica.

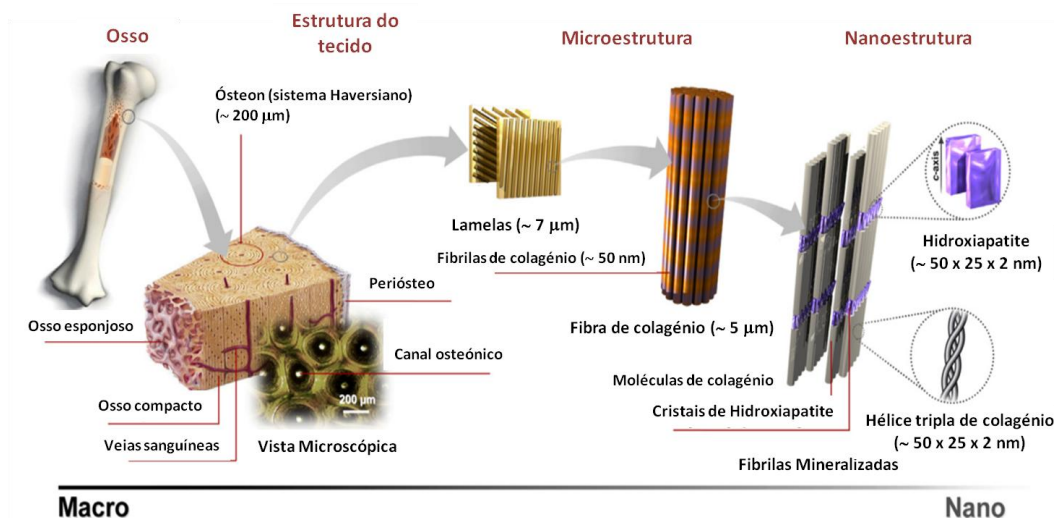


Figura 2.2: Estrutura hierárquica dos ossos a várias escalas de comprimento. A microestrutura do osso compacto consiste no sistema Haversiano (círculos em secção cruzada em vista microscópica) com canais osteónicos e lamelas. À nanoescala o sistema estrutural possui fibras de colagénio compostas por conjuntos de fibrilas mineralizadas de colagénio e hidroxiapatite. (Adaptado de [13]).

Os *scaffolds* de HAp estão entre os materiais mais estudados para a regeneração de um defeito ósseo devido à sua capacidade estrutural e funcional. No entanto, como já foi referido, a HAp tem pouca resistência à fratura e ao desgaste e, portanto, tem sido limitada a aplicações não sujeitas a carga. Para beneficiar das suas vantagens e superar as desvantagens, a HAp nanocristalina pode ser combinada com vários tipos de polímeros bioativos como o PDLA (poli (D,L - ácido láctico)) [19], PVP (polivinil pirrolidona) ou PEG (polietileno glicol) [20]. Esta combinação permite conceber materiais biocompósitos altamente porosos com controlo do tamanho de partícula, da fase de cristal e do grau de agregação. Outra alternativa é o uso de estruturas compostas por implantes metálicos revestidos com camada fina de HAp, uma vez que esses implantes possuem força mecânica favorável devido aos metais e bioatividade derivada da HAp. Os implantes metálicos revestidos com HAp promovem a osteointegração que ajusta a fixação e reduz o dano nos tecidos circundantes devido ao movimento [21].

2.2. Síntese de Hidroxiapatite

Como referido anteriormente, a hidroxiapatite sintética é um biomaterial de extrema importância para aplicações biomédicas. Por esta razão, foram desenvolvidos numerosos métodos para sintetizar pós de HAp de tamanho nanométrico.

Segundo Sadat-Shojai *et al.* [13] a produção de nanopartículas (NPs) de HAp pode ser obtida com recurso a diversos métodos de preparação, sendo os mais promissores os méto-

dos químicos aquosos. Os mesmos autores classificam as técnicas de síntese em cinco grupos principais, dentro dos quais existe uma vasta gama de condições de processamento que podem variar e dar origem a outros métodos. Na Tabela 2.1 são descritos os métodos a seco (com dois subgrupos), métodos aquosos (com seis subgrupos), processos a altas temperaturas (com dois subgrupos), e procedimentos de combinação de um ou mais métodos.

Tabela 2.1: Breve descrição de diferentes métodos de preparação de nano hidroxiapatite

Método de síntese	Descrição
Métodos a seco	Incluem a síntese no estado sólido e o processo mecânico-químico. Têm como vantagem a produção de HAp com elevada cristalinidade a partir de reagentes relativamente baratos.
Métodos com recurso a um solvente	São usadas soluções aquosas de diversas fontes de iões cálcio e fosfato. Os cristais de HAp são gerados por precipitação química, hidrólise, sol-gel, método hidrotermal ou por emulsão. Estes métodos permitem um controlo preciso da morfologia e tamanho das partículas, no entanto, apresentam dificuldades em controlar a cristalinidade e a pureza das nanopartículas.
Processos a altas temperaturas	Permitem a obtenção de HAp com elevada cristalinidade e boa homogeneidade química. Estes métodos envolvem combustão e pirólise e possuem fraco controlo no processamento das variáveis e na geração de agregados secundários.
Sínteses através de fontes biológicas ricas em cálcio	As fontes biológicas de cálcio são lixo ósseo, cascas de ovos, exosqueletos de organismos marinhos e derivados naturais de biomoléculas. Além de ser um processo ecológico, a HAp apresenta propriedades físico-químicas mais próximas da HAp biológica dos ossos. No entanto, estes métodos dificultam a produção de HAp de dimensões reduzidas.
Procedimentos combinados de dois ou mais métodos de síntese	Permite melhorar as características das nanopartículas produzidas. As combinações mais usadas são: hidrotermal/mecânico-químico, hidrotermal/hidrólise e hidrotermal/microemulsão.

Durante a síntese de HAp é considerado importante o controlo cuidadoso de parâmetros como o pH, tempo de reação, temperatura e concentração dos reagentes, juntamente com uma seleção adequada dos materiais precursores. Estes parâmetros e materiais podem afetar a composição e as propriedades do produto final [22].

2.2.1. Processo Sol-Gel

O processo sol-gel, representado na Figura 2.3, é um método de solução químico usado para gerar materiais cerâmicos na forma de filmes finos, fibras ou pós, pelo que tem sido muito utilizado na síntese de hidroxiapatite. Devido à elevada reatividade do pó obtido, não necessita de um valor elevado de pH nem de elevada temperatura de sinterização para que ocorra a formação de HAp, o que resulta na ausência de fenómenos de degradação durante a sinterização [9][23]. O método sol-gel proporciona uma mistura molecular de cálcio e fósforo capaz de melhorar a homogeneidade química e permite a preparação de pós com alta pure-

za, pelo facto de ser possível um controlo preciso dos parâmetros de síntese. Deste processo resultam cristais de tamanho nanométrico que favorecem o contato e a estabilidade entre osso sintético e osso biológico [23].

O método sol-gel processa-se em cinco etapas: formação do sol, formação do gel, envelhecimento, secagem e sinterização. Sol é uma suspensão coloidal de partículas de dimensão entre 1 e 100 nm dispersas num solvente, enquanto gel é um sistema formado pela estrutura semirrígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. O gel é formado quando o solvente do sol começa a evaporar e as partículas ou iões que permanecem começam a agregar-se, perdendo a homogeneidade e estabilidade. Caso existam reações químicas incompletas no final da formação do gel, estas continuarão na etapa seguinte (envelhecimento), reforçando a rede [24].

Na fase seguinte, envelhecimento, ocorre a evaporação do solvente do interior dos poros do gel. Nesta etapa é comum a ocorrência de processos de hidrólise responsáveis pela quebra das cadeias e diminuição do seu peso médio. Além disso, mecanismos como a polimerização, espessamento e transformação de fase podem alterar as propriedades físicas do gel. O processo de secagem serve para remover a fase líquida do gel formando um material poroso e originando dois tipos de estruturas: aerogéis (em que ocorre extração do solvente) ou xerogéis (quando se dá a evaporação natural do solvente) [24].

Por fim, a sinterização proporciona um aperfeiçoamento das propriedades mecânicas. Nesta fase, o material desloca-se, essencialmente, num fluxo viscoso ou por difusão em cristais. Os processos de desidroxilação estrutural e relaxamento que ocorrem durante a sinterização levam a aquecimentos mais rápidos permitindo, por sua vez, sinterizações a temperaturas mais baixas [24].

As vantagens de utilização do método sol-gel são a obtenção de pós de tamanho reduzido, porosidade controlada, elevada uniformidade, facilidade em moldar materiais dentro de geometrias complexas no estado gel e a capacidade de sinterização a temperaturas relativamente baixas. Além disso, é um método simples, económico e eficaz para produzir revestimentos de alta qualidade [25]. Relativamente a outros processos de síntese, o sol-gel não requer o controlo preciso e exato das condições de reação.

Kuriakose *et al.* [26] desenvolveram hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) pura, estável, nano cristalina e estequiométrica a baixa temperatura (85°C) pelo processo sol-gel. Os reagentes ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) foram dissolvidos em etanol e o produto foi sintetizado a 400°C, 750°C e 1200°C.

Fathi *et al.* [9] produziram nanopós sintéticos de HAp via sol-gel em que os reagentes utilizados foram o nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e pentóxido de fósforo (P_2O_5) em etanol absoluto. Os autores sintetizaram pós com bioreabsorção superior à da HAp convencional e avaliaram o comportamento *in vitro* das substâncias em fluido corporal simulado. A HAp exibiu uma estrutura nanométrica de apatite carbonatada de baixa cristalinidade, semelhante à da apatite de osso humano. Analogamente, as funcionalidades cristalográficas e químicas da nanoHAp preparada mostraram ser idênticas às apatites biológicas.

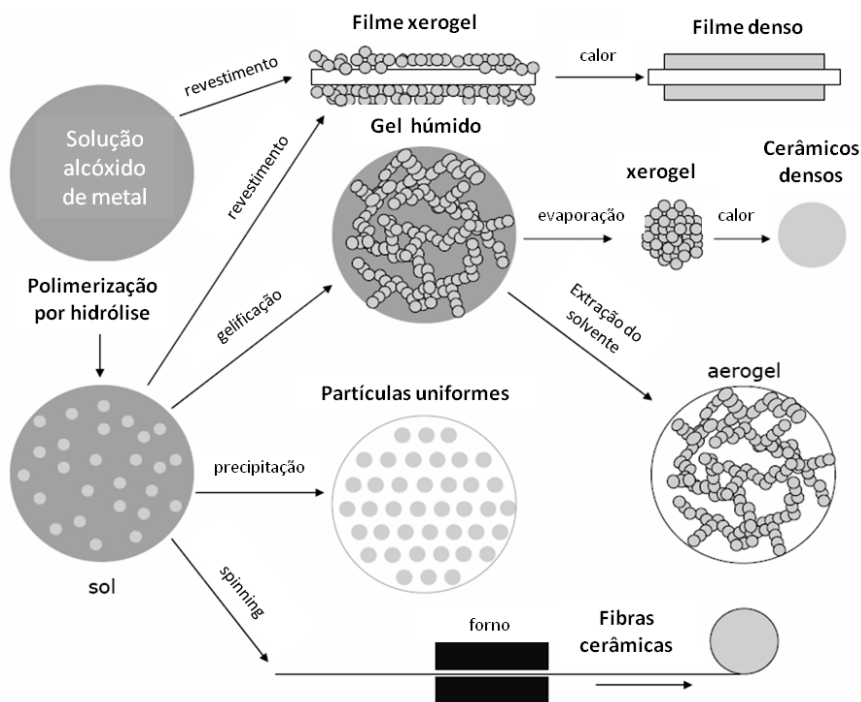


Figura 2.3: Representação esquemática das diferentes etapas e direções do processo sol-gel. (Adaptado de [27]).

2.3.Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são formadas por partículas da ordem dos nanómetros (10^{-9} m) que, por estarem entre o estado molecular e atômico, possuem propriedades físicas e químicas bastante diferentes das observadas em materiais à macroescala. As NPMs têm várias aplicações na área de biomédica e nanomedicina. Algumas aplicações são a separação magnética, transporte de fármacos, tratamentos por hipertermia magnética e contraste em imagens de ressonância magnética [28]. Através da funcionalização de NPMs é possível a detecção de bactérias, purificação de proteínas, imobilização de enzimas, redução de contaminação, etc. [29].

Para aplicações biomédicas, consideram-se geralmente materiais com elevada magnetização de saturação, tais como metais de transição (por exemplo, Fe, Co, Ni) ou óxidos metálicos (por exemplo, Fe_3O_4 , Fe_2O_3). As nanopartículas de óxido de ferro são um dos materiais

magnéticos mais investigados no que diz respeito aos métodos de síntese, funcionalização e aplicações. Em particular, a magnetite (Fe_3O_4) apresenta propriedades magnéticas, elétricas e óticas extraordinárias, sendo o material eleito em terapia do cancro por hipertermia magnética devido ao facto de possuir os níveis mais baixos de toxicidade e o mais elevado nível de aquecimento [30].

As propriedades finais das nanopartículas magnéticas são fortemente influenciadas pelo método e condições de síntese devido às modificações morfológicas e composicionais (forma, tamanho e distribuição de partículas) dessas partículas [30].

2.3.1. Conceitos básicos de magnetismo

O comportamento dos materiais magnéticos num campo magnético externo é determinado pela origem dos seus dipolos e pela natureza da interação entre eles. Quando um material magnético é colocado na presença de um campo magnético externo de intensidade H , os momentos de dipolo magnético individuais (μ_{ati}) do material contribuem para a indução de um campo magnético B , determinado conforme a Equação 2.1, onde μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo [28][31].

$$B = \mu_0 (H + M) \quad \text{Equação 2.1}$$

M é a magnetização descrita como sendo a densidade de momento de dipolo magnético atómico (μ_{at}) por unidade de volume (V), Equação 2.2, onde N é o número de átomos.

$$M = \frac{1}{V} \sum_i^N \mu_{\text{ati}} \quad \text{Equação 2.2}$$

A resposta magnética dos materiais depende da sua estrutura atómica e da temperatura e pode ser classificada com base na sua suscetibilidade magnética (χ) (Equação 2.3).

$$M = \chi H \quad \text{Equação 2.3}$$

Podem-se definir estados magnéticos do sistema, dependendo da configuração dos momentos de dipolo magnético. Os materiais diamagnéticos (DM) e paramagnéticos (PM) exibem pouco magnetismo e apenas na presença de um campo aplicado, pois os momentos de dipolo estão desordenados e não interagem. Por outro lado, os materiais podem possuir estados magnéticos ordenados que, devido à interação magnética, os momentos de dipolo ficam acoplados. Estes são magnéticos mesmo sem nenhum campo aplicado e podem ser ferromagnéticos (FM, alinhamento paralelo) ou antiferromagnéticos (AFM, alinhamento anti-paralelo), dependendo da interação entre os eletrões [28]. O estado PM (desordenado) está sempre presente em materiais com $\mu \neq 0$, a altas temperaturas, enquanto um estado ordenado (FM ou AFM) pode ser induzido com a diminuição da temperatura caracterizando uma

transição de fase magnética. A transição de PM para FM ocorre a uma certa temperatura de Curie (T_C) e, no caso AFM, define-se essa temperatura como temperatura de Néel (T_N) [31].

Abaixo de T_C , e devido ao comportamento FM do sistema, as partículas possuem momentos magnéticos efetivos (μ), mas estes não interagem. Como μ é várias ordens de grandeza maior que μ_{at} , esse estado magnético é designado de superparamagnético (SPM). Quando a T_C ocorre a temperaturas elevadas, estes materiais possuem magnetização espontânea à temperatura ambiente. Para temperaturas mais baixas, as NPMs encontram-se num estado denominado estado bloqueado (abaixo da temperatura de bloqueio (T_B)), que surge devido ao facto da relaxação do sistema ocorrer muito devagar. Esses dois estados magnéticos não são observados em materiais em *bulk*, mas apenas em sistemas nanométricos [31].

Na Figura 2.4 está ilustrado o comportamento da magnetização espontânea através de medidas do tipo ZFC/FC (do inglês, *zero field cooling* / *field cooling*). O procedimento ZFC consiste em arrefecer a amostra num campo magnético nulo, iniciando, posteriormente, as medidas a baixas temperaturas (~ 5 K) até à temperatura ambiente. No caso das medições em FC a amostra é arrefecida na presença de um campo magnético. Têm início a baixas temperaturas e terminam à temperatura, normalmente, ~ 5 K [31].

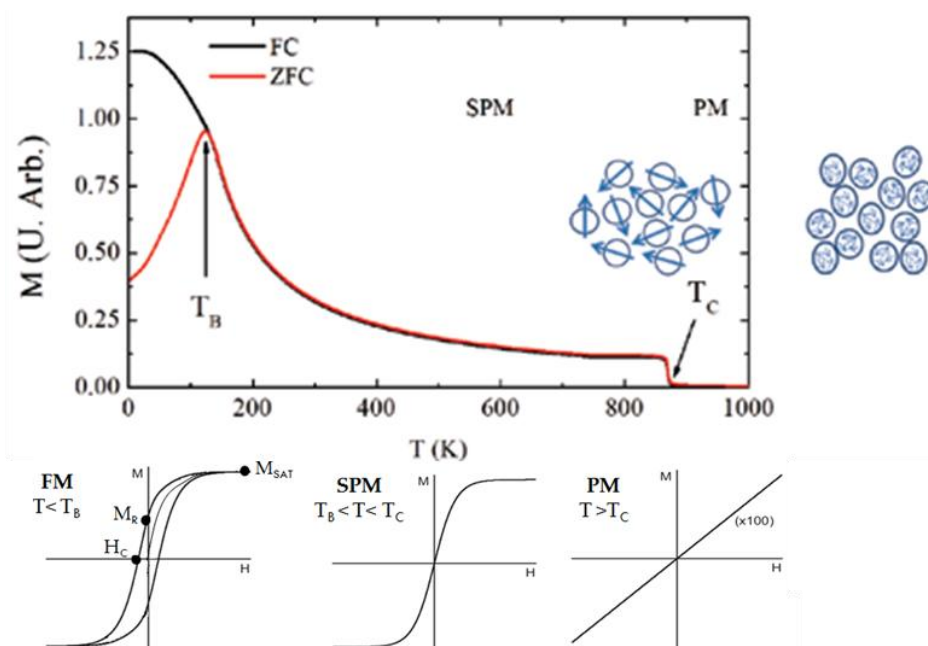


Figura 2.4: Magnetização (ZFC/FC) em função da temperatura de um conjunto de nanopartículas magnéticas. Curvas de magnetização características em função do campo magnético no estado bloqueado ($T < T_B$), superparamagnético ($T_B < T < T_C$) e paramagnético ($T > T_C$). (Adaptado de [31]).

As curvas de magnetização apresentadas na Figura 2.4 mostram a dependência da suscetibilidade magnética dos materiais da intensidade do campo magnético (H). Em materiais ferromagnéticos é frequentemente analisada a histerese, isto é, a irreversibilidade do proces-

so de magnetização (no estado bloqueado), saturando a um certo valor de M para elevados valores de H (M_{sat}). Devido a barreiras ao campo magnético, como impurezas ou a anisotropia da rede cristalina, quando o campo é levado a zero, a magnetização não se anula, apresentando uma magnetização remanescente, M_R . Para reverter os efeitos causados pela magnetização induzida pelo campo aplicado, é necessário aplicar um campo magnético em direção oposta ao campo anteriormente aplicado chamado de campo coercivo ou coercividade (H_c), de modo a tornar a magnetização nula. Com isto, as curvas de magnetização são abertas designando-se ciclos de histerese, que dependem do tamanho das partículas. Como referido anteriormente, no caso de nanopartículas magnéticas é observado o efeito de SPM e apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo e quando este é retirado a partícula não permanece magnetizada [28][31].

Em materiais ferromagnéticos o estado de menor energia, na ausência de campo aplicado, é o estado desmagnetizado (momento magnético total é zero). Se o tamanho for reduzido, a energia de superfície, tal como a energia da parede de domínio, torna-se mais elevada do que a energia de volume, assim como energia desmagnetizante. Abaixo de uma certa dimensão crítica é mais favorável energeticamente remover as paredes de domínios, tal como está representado na Figura 2.5. Nesse limite, existe um único domínio magnético, como se fosse um íman permanente manométrico com propriedades superparamagnéticas [31].

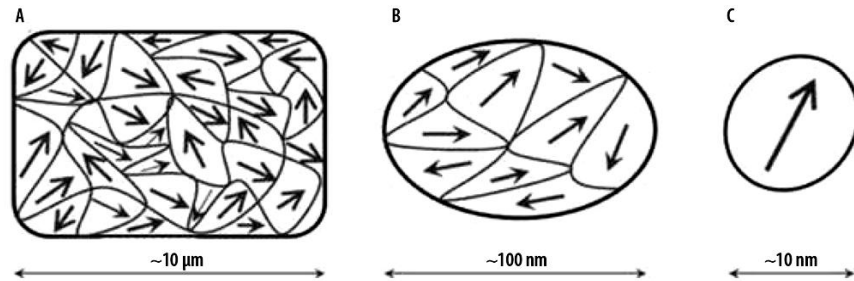


Figura 2.5: Representação da configuração dos domínios magnéticos em materiais com diferentes tamanhos. A - Estado desmagnetizado em materiais ferromagnéticos. B - Remoção de paredes de domínios. C - Único monodomínio magnético com propriedades superparamagnéticas [31].

2.4.Hipertermia Magnética

A hipertermia magnética baseia-se na localização de nanopartículas magnéticas na zona alvo e na aplicação de um campo magnético externo alternado de maneira a provocar uma geração de calor por parte das NPMs. O campo magnético possui a vantagem de não ser absorvido pelos tecidos vivos e permitir uma profunda penetração nesses tecidos. As nanopartículas superparamagnéticas, principalmente NPMs de óxido de ferro, têm a capacidade de trocar a sua direção de magnetização entre paralelo e antiparalelo consoante a direção do campo magnético aplicado, permitindo a transferência de energia magnética para as

partículas em forma de calor [32]. Este calor é gerado através da aplicação de um campo eletromagnético externo de 50 a 300 kHz, sendo as NPMs a via de aquecimento mais efetiva e não-agressiva [30].

Estas capacidades são frequentemente usadas *in vivo* para aumentar a temperatura do tecido tumoral, destruindo as células cancerígenas por hipertermia. A temperatura deve variar entre 41°C (hipertermia moderada) e 43°C (hipertermia avançada) e deve ser mantida durante 20 a 60 minutos [30]. A temperatura de 43°C é suficiente para matar as células tumorais sem afetar as células normais. Este procedimento tem efeitos mínimos no tecido saudável devido ao facto de as células afetadas pelo cancro serem mais sensíveis à temperatura do que as células envolventes. Assim, quando as NPMs são injetadas num órgão com tumor, estas irão acumular-se no tecido cancerígeno devido à sua elevada e desorganizada vascularidade, aquecendo efetivamente o tumor em oposição ao tecido saudável em redor [29].

Os campos magnéticos de alta frequência podem causar aquecimento em materiais magnéticos por um dos quatro mecanismos: correntes de Foucault, perda de histerese, relaxamento Browniano e relaxamento de Néel. Em materiais em *bulk*, as correntes de Foucault, induzidas pela rápida mudança do fluxo magnético, podem produzir aquecimento resistivo significativo. O deslocamento das paredes de domínio magnético em materiais multidomínios (ou seja, perda de histerese) também pode gerar energia térmica. As correntes de Foucault são significativas apenas em materiais na escala de centímetro ou maior e, portanto, são claramente ineficazes para hipertermia de nanopartículas magnéticas. Em tais partículas, o aquecimento é realizado rotando o momento magnético de cada partícula contra uma barreira de energia. Se as condições forem tais que ocorre uma rotação da própria partícula por inteiro, então a partícula sofre relaxamento browniano e a energia térmica é fornecida através da tensão de cisalhamento no fluido circundante. Se o momento rodar enquanto a própria partícula permanece fixa, a partícula sofre relaxamento de Néel e a energia térmica é dissipada pelo rearranjo de momentos de dipolo atómico dentro do cristal. Posto isto, quando as NPs estão em suspensão os dois tipos de relaxação estão presentes. No entanto, quando as NPs são colocadas diretamente dentro do corpo ou do tecido, estas são ocupadas pelas células tumorais e permanecem fixas, pelo que não ocorre relaxamento Browniano quando um campo magnético alternado é aplicado [33].

Uma vez que cada uma das nanopartículas superparamagnéticas em suspensão consiste num único domínio, cada partícula possui um momento magnético constante. Na ausência de um campo magnético, a orientação desse momento será determinada pela anisotropia cristalina da partícula. No entanto, um campo magnético aplicado pode fornecer energia suficiente para deslocar o momento da orientação preferida e o relaxamento do momento de

volta para a posição de equilíbrio liberta energia térmica que resulta em aquecimento local [33].

As NPMs nomeadas para hipertermia magnética devem satisfazer as seguintes condições: distribuição de tamanho uniforme, elevada magnetização, elevada cristalinidade, capacidade de se dispersar em solução e não apresentar toxicidade. Além disso, as partículas usadas no tratamento devem possuir dimensões menores que 100 nm. Tendo em conta todas estas características, as NPMs eleitas para este efeito são os nanocristais de magnetite [30][34]. Apesar disso, Hou *et al.* [35] estudaram com sucesso o comportamento *in vivo* de nanopartículas magnéticas de HAp dopada com iões ferro em ensaios de hipertermia magnética.

2.5. Estado da Arte: Dopagem de HAp com Ferro

A presente dissertação visa desenvolver e caracterizar nanopartículas de hidroxiapatite pura e dopada com diferentes quantidades de iões Fe^{3+} , com aplicabilidade em hipertermia magnética. O método de síntese destes compostos é um processo bastante simples denominado sol-gel. Posto isto, este subcapítulo visa definir o estado da arte do tema descrito.

Amostras compostas por hidroxiapatite (HAp , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e fosfato de tricálcio ($\beta\text{-TCP}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) apresentam uma analogia com a parte biomineral de nano-hidroxiapatite dos ossos, a qual é naturalmente modificada pela substituição de diversos iões. A substituição do Ca^{2+} por iões metálicos pode ser usada para aperfeiçoar as propriedades biológicas dos cerâmicos produzidos, devido a mudanças nas propriedades físico-químicas que estas impurezas produzem [36]. Esta substituição promove mudanças nas propriedades estruturais, cristalinidade e morfologia, assim como mudanças nos parâmetros de rede, tal como mostraram Batista *et al.* nas substituições com iões Zn^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{3+} na HAp [16].

Renaudin *et al.* [36] apresentaram uma visão geral dos mecanismos de dopagem por sol-gel de amostras de HAp e $\beta\text{-TCP}$ usando catiões do primeiro período dos metais de transição da tabela periódica (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}), em relação à temperatura de sinterização. Os resultados indicaram a preparação de fosfato de cálcio bifásico sintético dopado que pode ser usado para melhorar as propriedades biológicas, em particular ajustando as quantidades de libertação após interação com fluidos biológicos. Um mecanismo de dopagem intersticial no canal hexagonal da HAp é observado para os seis catiões investigados. O estudo químico e cristalográfico efetuado distinguiu um mecanismo de dopagem de HAp complexo, principalmente realizado por um processo intersticial combinado com a substituição de cálcio para os catiões maiores da série, conduzindo a uma HAp potencialmente deficiente em cálcio. O processo de síntese sol-gel foi também usado por Gozalian *et al.* [37] na produção de HAp e $\beta\text{-TCP}$ com diferentes quantidades de magnésio incorporadas.

O ferro é um elemento vital da função celular dentro do corpo humano. Podem encontrar-se altas concentrações de ferro nos rins e no sistema circulatório. Nos ossos e dentes está presente como um oligoelemento, ou seja, essencial mas em pequenas quantidades [38][14].

Posto isto, Gomes *et al.* [39] produziram fosfatos de cálcio bifásicos, isto é, compostos por HAp e β -TCP, dopados com ferro ($\text{Ca}_{10}\text{Fe}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-3x}\text{O}_{3x}$) pelo método sol-gel. Os autores fizeram um estudo detalhado sobre a incorporação de Fe^{3+} e a sua dependência com a temperatura, sinterizando as amostras com diferentes quantidades de ferro desde 500°C a 1100°C. Os mesmos concluíram que a temperatura pode ser usada para manipular a dopagem de acordo com a aplicação médica pretendida.

Trinkunaite-Felsen *et al.* [40] sintetizaram e caracterizaram HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{10}$) pura e não tóxica dopada com diferentes percentagens molares de ferro. O método de síntese foi o processo sol-gel com recurso a nitrato de ferro nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), fosfato de diamónia hidrogenado ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) e conchas marinhas *Macoma báltica* (L.) como precursor de cálcio. Do mesmo modo, Kaygili *et al.* [41] usaram o método sol-gel para sintetizar amostras de HAp dopada com várias percentagens atômicas de iões Fe^{3+} , mas utilizaram álcool de polivinil (PVA), e nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) como precursor de cálcio.

Li *et al.* [21] prepararam partículas superparamagnéticas e não citotóxicas de HAp dopadas com Fe^{3+} e Mn^{2+} . Também Po-On *et al.* [42] investigaram a substituição de ferro e manganês na HAp, com a fórmula $\text{Ca}_{9,4}\text{Fe}_{0,4}\text{Mn}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, gerada pelo método de coprecipitação. O mesmo método de síntese foi usado por Low *et al.* [43] para produzir hidroxiapatites e oxipatites férricas de composição $\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x^{3+}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}\text{O}_x$.

Por outro lado, Chandra *et al.* [44] produziram HAp com diferentes quantidades de iões ferro incorporadas pelo método hidrotermal e com aplicação em libertação de fármacos.

Os estudos realizados por Ereiba *et al.* [45] revelaram que as amostras de HAp dopadas com ferro apresentam uma solubilidade e uma taxa de dissolução maior do que a amostra de HAp pura. Estes resultados provaram que o ferro aumenta a bioatividade da HAp *in vitro*, isto é, a capacidade de se unir diretamente ao osso e formar novo tecido ósseo após a implantação no tecido biológico.

Wu *et al.* [46], assim como, Tampieri *et al.* [47], estudaram o potencial de HAp biomagnética no tratamento por hipertermia. Os autores produziram as partículas magnéticas através da dopagem da HAp com iões ferro pelo método de coprecipitação. Hou *et al.* [35] testaram, posteriormente, o desempenho *in vivo* das amostras produzidas por Wu *et al.* [46]. A HAp dopada com ferro atuou no tratamento do cancro através de hipertermia magnética com sucesso.

Para terminar este subcapítulo, é de referir que Kyriacou *et al.* [14] e Jiang *et al.* [15] investigaram o local geométrico dos iões Fe^{2+} e Fe^{3+} na estrutura da HAp dopada com ferro. Os autores realizaram simulações atómicas para obter estimativas da geometria local e tensão de rede associada aos locais de substituição. Ambos os estudos descreveram o Ca(1) como sendo o sítio do cálcio preferido pelos iões Fe^{3+} na estrutura de HAp. Por outro lado, é apresentada uma objecção por Gomes e Renaudin *et al.* [39][36] ao propor que o catião Fe^{3+} é inserido no espaço intersticial da estrutura da HAp (posição designada *Wyckoff 2b*) ao longo do canal hexagonal. A descoberta deste local de inserção de catiões na rede da HAp é feita primeiramente através da dopagem com o ião Zn^{2+} [48].

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese de Hidroxiapatite

A síntese dos pós de hidroxiapatite (HAp) pura (Figura 3.1) e dopada com três quantidades diferentes de íons Fe^{3+} foi feita recorrendo ao método sol-gel descrito anteriormente.

3.1.1. Materiais

O método sol-gel é um procedimento muito simples em que os precursores da HAp são o nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, *Panreac*) e o pentóxido de fósforo (P_2O_5 , *Sigma-Aldrich*) e o solvente é etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, *Panreac*). Na síntese de HAp magnética é adicionado um terceiro precursor, cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *Sigma-Aldrich*).

3.1.2. Método experimental

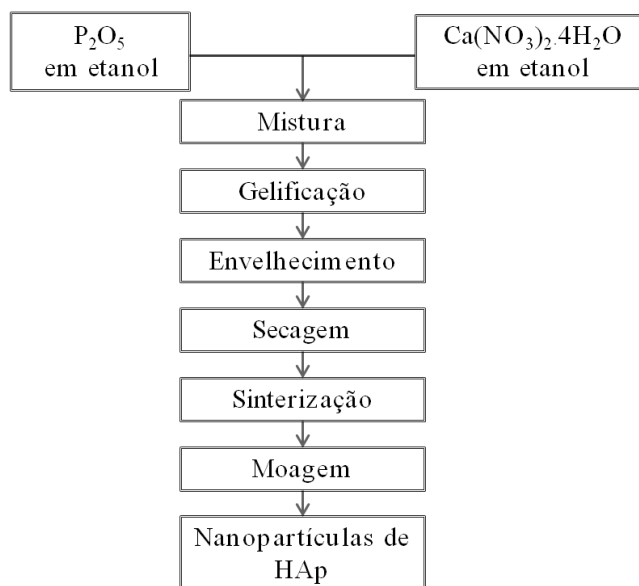
A fórmula química dos compostos produzidos deverá ser: $(\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, em que $x = 0, 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5 . A razão molar de $(\text{Ca}+\text{Fe})/\text{P}$ utilizada é igual a 1,67, pois é a razão molar entre cálcio e fósforo da hidroxiapatite ($\text{Ca}/\text{P}=10/3$).

O primeiro passo da síntese é a preparação de três soluções em 20 mL de etanol absoluto. Dissolve-se $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 2 mL de etanol, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 8 mL de solvente e, por fim, P_2O_5 em 10 mL de etanol absoluto. A Tabela 3.1 mostra a quantidade, em gramas, de cada precursor dependendo da concentração atômica (x nominal) de íons Fe^{3+} a incorporar na estrutura da HAp. É também apresentada a percentagem molar de ferro correspondente a cada x nominal.

Tabela 3.1: Quantidade de massa (em gramas) de cada precursor, dependendo da quantidade atômica de ferro (x nominal) ou percentagem molar de ferro

x nominal	0	0,25	0,5	1	2	3	5
%mol de Fe	-	2,12	4,18	8,50	18,39	30,17	62,79
FeCl ₃ .6H ₂ O (g)	-	0,122	0,234	0,460	0,910	1,361	2,262
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (g)	3,940	3,837	3,739	3,542	3,148	2,755	1,967
P ₂ O ₅ (g)	0,710	0,701	0,710	0,710	0,710	0,710	0,710

Seguidamente misturam-se as soluções sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 10 min. Após dissolução completa, coloca-se a mistura num banho de óleo a 90°C até formação de um gel (aproximadamente 1 h). O terceiro passo é a secagem do gel numa estufa a 80°C durante 24 h [9][24]. Os géis secos são posteriormente sinterizados a 600°C, 700°C e 800°C (temperaturas escolhidas com base na literatura); com uma taxa de aquecimento de 10°C/min sem atmosfera controlada. Permanecem 1 h na respetiva temperatura de sinterização, arrefecendo depois até à temperatura ambiente. Por último, os produtos sinterizados são esmagados com o auxílio de um almofariz e de um pilão, para obter pós homogêneos de tamanho reduzido.

**Figura 3.1: Fluxograma da síntese de nanopartículas de HAp pura via sol-gel. (Adaptado de [23]).**

3.2. Técnicas de Caracterização

A caracterização dos pós de HAp produzidos é essencial visto que estes têm aplicações em sistemas biológicos. Posto isto, é necessário recorrer a diversas técnicas de modo a obter informações sobre o tamanho, morfologia, composição química, propriedades magnéticas e propriedades térmicas das amostras. Essas técnicas incluem: difração de raios-X (DRX), espe-

troscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA), magnetização através do magnetômetro de amostra vibrante (VSM), e microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

3.2.1. Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) é um fenômeno de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria ordenada, neste caso, a sequência periódica de átomos no cristal. Para ocorrer difração é necessário que o comprimento de onda da radiação incidente seja da mesma ordem de grandeza do espaçamento interatômico do material analisado, ou seja, da ordem dos angstroms.

Os difratogramas das amostras foram adquiridos no difratômetro de raios-X *X'Pert PRO PANalytical*, com um intervalo de 2θ de 0,033, desde os 10° aos 70°, através de radiação Cu-K α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$). A análise dos espectros obtidos foi feita através do *software OriginPro 8*.

A técnica de DRX permite avaliar a pureza e composição atômica e molecular da estrutura cristalina das diferentes amostras produzidas. A partir da análise do feixe difratado, obtém-se informação sobre o arranjo atômico da amostra cristalina, ou seja, a simetria e as distâncias interatômicas que determinam a designada célula unitária. Esta análise requer o conhecimento das simetrias envolvidas no acondicionamento dos átomos que formam o material, isto é, da sua estrutura cristalina [16]. A hidroxiapatite apresenta um sistema de simetria cristalina hexagonal.

Esta análise possibilita o cálculo do diâmetro de cristalito a partir da equação de Scherrer (Equação 3.1), em que D é o diâmetro, β é a largura a meia altura do pico máximo de DRX, λ é o comprimento de onda da radiação-X, k é uma constante relacionada com a forma cristalina (no caso da HAp, k é igual a 0,9) e θ é o ângulo de difração do pico.

$$D = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 3.1}$$

Além disso, a partir do espectro de difração é possível obter o valor dos parâmetros de rede da estrutura cristalina. Com recurso à Lei de Bragg (Equação 3.2), obtém-se a distância entre os planos do cristal ou distância interplanar designada por d . λ é o comprimento de onda da radiação incidente e θ é o ângulo de difração medido em relação aos raios-X. Seguidamente, através da fórmula relativa ao tipo de estrutura em análise (Equação 3.3), neste caso, hexagonal, obtém-se os parâmetros de rede $a = b$ e c . Os índices h , k e l são os índices de Miller da célula unitária que caracterizam o conjunto de planos cristalográficos. O pico de

DRX (002) da HAp é usado para calcular o valor do parâmetro $a = b$ da célula unitária. Para o parâmetro c , é usado o pico de difração (300).

$$\lambda = d \sin \theta \quad \text{Equação 3.2}$$

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad \text{Equação 3.3}$$

3.2.2. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

A análise de FTIR é usada para caracterizar as partículas e permite saber quais os grupos funcionais presentes nas amostras e inferir o tipo de ligações químicas que ocorrem através dos espectros de absorção de radiação infravermelha. Estes foram adquiridos através do espectrofotômetro ATR-FTIR Nicolet 6700 – *Thermo Electron Corporation Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectrometer*, numa gama de números de onda entre os 4000 cm^{-1} e os 480 cm^{-1} , com um ângulo de incidência de amplitude igual a 45°.

O espectro de infravermelhos é formado por bandas correspondentes a transições entre diferentes níveis vibracionais, devido à absorção de radiação infravermelha (IV). Os modos de vibração que podem ocorrer na molécula designam-se de *stretching*, isto é, deformação axial, onde se dá uma variação no comprimento de ligação ou *bending*, deformação angular, em que existe uma mudança do ângulo de ligação entre os átomos. No entanto, apenas os modos de vibração ativos em IV, os quais são acompanhados por uma variação do momento dipolar da molécula, dão origem a bandas no espectro de vibração.

3.2.3. Análise térmica diferencial e termogravimétrica

A análise térmica diferencial (DTA) fornece informação sobre as reações endotérmicas e exotérmicas que ocorrem numa amostra quando submetida a um gradiente de temperatura. No caso da análise termogravimétrica (TGA), esta é útil para avaliar a estabilidade térmica e composição de uma amostra através da variação de massa da mesma quando submetida ao mesmo gradiente de temperatura. As análises térmicas foram realizadas através do equipamento NETZSCH STA 449 F3 Jupiter®. A quantidade de amostra não sinterizada necessária é cerca de 50 mg e a aquisição foi realizada desde 25°C até 1050°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Todo o processo foi realizado sob atmosfera de azoto.

3.2.4. Magnetometria de amostra vibrante

O magnetómetro de amostra vibrante, do inglês, *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM) é um instrumento de medida da magnetização das amostras em função da temperatura (curvas do tipo FC/ZFC) ou em função do campo magnético.

Esta análise foi realizada na Universidade de Aveiro com recurso ao magnetómetro VSM 10 T (*Cryogenic-Cryofree*). As curvas de histerese foram obtidas a 7 K e 300 K com um campo magnético aplicado de ± 2 T.

3.2.5. Microscopia eletrónica de transmissão

A análise por microscopia eletrónica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*) das amostras previamente sintetizadas foi realizada no Instituto Superior Técnico em Lisboa, no equipamento *Hitachi H-8100 II*, com emissão termiônica, LaB₆, e resolução ponto a ponto de 2,7 Å.

Esta técnica é usada para investigar a morfologia e tamanho médio dos pós obtidos através da análise das imagens adquiridas, dando informação sobre o tamanho do núcleo das partículas, tanto da parte cristalina como amorfa, indicando o valor da média ponderada. A imagem que se obtém é formada por um feixe estático de eletrões que atravessa a amostra. As amostras analisadas foram $x = 0,5$ e $x = 2$ preparadas com 0,05% (m/V) em etanol absoluto (C_2H_5OH , *Panreac*) que posteriormente se dispersou com ultrassons.

3.3. Ensaaios de Hipertermia Magnética

As amostras de HAp dopadas com Fe^{3+} produzidas de acordo com o protocolo descrito no subcapítulo 3.1 foram submetidas a ensaios de hipertermia magnética. O objetivo é apurar a eficiência destes materiais no tratamento de cancro ósseo através do aumento de temperatura até pelo menos 43°C de modo a matar apenas as células cancerígenas.

As medições foram feitas a partir de séries DM100 através do sistema *Nb Nanoscale Biomagnetics*. Este aparelho possibilita medições a diferentes intensidades de campo magnético até 24 kA.m⁻¹ com a frequência fixa de 418,5 kHz.

3.3.1. Materiais

Os pós produzidos foram dissolvidos em etanol absoluto (C_2H_5OH , *Panreac*).

3.3.2. Método experimental

Cada amostra sinterizada a 700°C com diferentes quantidades de ferro foi dissolvida em etanol absoluto de modo a obter uma relação de 5% (m/V). Após 5 minutos de sonicação o depósito formado no fundo do frasco manteve-se. Foi medido para um frasquinho 1 mL de solução com os pós imersos e preparadas três réplicas de cada amostra. Cada frasquinho foi inserido no equipamento com uma sonda ótica no interior, e submetido a um campo magnético alternado de intensidade 24 kA.m⁻¹ e frequência igual a 418,5 kHz, durante 10 minutos.

3.4. Testes de Bioatividade

O potencial das amostras produzidas na regeneração de tecido ósseo pode ser avaliado através da incorporação do material num fluido com concentração iônica próxima da do plasma humano, simulando o fluido corporal (SBF, do inglês *simulated body fluid*). A bioatividade dos materiais é manifestada através da formação de apatites na superfície das amostras comprovando a sua capacidade de ligação aos ossos.

3.4.1. Materiais

O SBF foi preparado a partir dos seguintes reagentes: cloreto de sódio (NaCl 99,5%, *Sigma*), bicarbonato de sódio (NaHCO₃, *Merck*), cloreto de potássio (KCl, *Panreac*), hidrogenofosfato disódico (Na₂HPO₄, *Panreac*), cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O, *ROTH*), ácido clorídrico 37% (V/V) (HCl, *Carlo Erba*), cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O, *Honeywell* | *Fluka*), sulfato de sódio (Na₂SO₄, *Fluka*), tris(hidroximetil)aminometano (C₄H₁₁NO₃, *Alpha Aesar*) e água ultrapura. Na preparação das pastilhas foi adicionado acetato de polivinila ((C₄H₆O₂)_n, PVA, *Merck*) aos pós.

3.4.2. Método experimental

Para realizar os testes mencionados foi preparado SBF 1,5x (isto é, a concentração de sais é 1,5 vezes superior ao que se encontra no fluido corporal). De modo a preparar 1 L de solução, adicionaram-se os vários reagentes, sob agitação magnética, pela ordem apresentada. A 700 mL de água ultrapura acrescentou-se 9,818 g de NaCl; 3,402 g de NaHCO₃; 0,559 g de KCl; 0,213 g de Na₂HPO₄; 0,457 g de MgCl₂.6H₂O; 15 mL de HCl 1 M; 0,582 g de CaCl₂.2H₂O; 0,108 g de Na₂SO₄ e 9,095 g de tris (C₄H₁₁NO₃). Por fim, foi adicionado HCl 1 M com o auxílio de um conta-gotas até o pH atingir o valor de 7,4. Para perfazer o volume de 1 L juntou-se água ultrapura.

Foram sintetizadas as amostras de $x = 0$; 0,5 e 2 até ao passo da secagem, isto é, antes da sinterização. Cerca de 500 mg de pó seco de cada uma das amostras foram prensados de modo a obter pastilhas com 13 mm de diâmetro e cerca de 2,5 mm de espessura. De modo a aumentar a consistência das pastilhas, adicionou-se 5 µL de PVA 5% (m/V) aos pós não sinterizados. Foi aplicada uma pressão de 2 toneladas durante 1 minuto. De seguida, as pastilhas foram sinterizadas a 800°C durante 1 h, pesadas (P_1) e imersas em SBF durante 3, 7, e 10 dias a temperatura igual a 37°C.

O volume de SBF (V_s) usado para cada amostra foi calculado a partir da área superficial (A_s) das pastilhas obtidas como mostra a Equação 3.4.

$$V_s \text{ (mL)} = \frac{A_s \text{ (mm}^2\text{)}}{10} \quad \text{Equação 3.4}$$

A solução foi trocada a cada 2 dias e após o tempo estipulado as pastilhas foram retiradas do SBF, lavadas com água ultrapura e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, as pastilhas foram de novo pesadas (P_2). Posto isto, a percentagem de peso ganho da amostra deve ser calculada através da Equação 3.5.

$$P(\%) = \frac{P_2 - P_1}{P_1} * 100 \quad \text{Equação 3.5}$$

Por fim, a morfologia da superfície das amostras testadas deveria ser analisada através de imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

3.5. Testes de Citotoxicidade

De forma a averiguar a viabilidade celular aquando do contacto das células com hidroxiapatite pura e com as diferentes concentrações de ferro previamente sintetizadas, foram efetuados ensaios de citotoxicidade em linhas celulares Vero (células do rim de macaco do tipo fibroblasto).

As linhas de células aderentes crescem *in vitro* até que toda a superfície disponível para a adesão celular esteja coberta por células ou até que os nutrientes se tenham esgotado. Para realizar a passagem, as células devem ser soltas do substrato e colocadas em suspensão [49]. O procedimento adotado para os ensaios de citotoxicidade foi o método de extração e a viabilidade celular foi investigada através do teste da resazurina. A resazurina é um corante azul não fluorescente que é reduzida a resorufina, composto cor-de-rosa e fluorescente, pelas células metabolicamente ativas [50].

3.5.1. Materiais

De modo a manter as culturas livres de contaminantes como bactérias, fungos e micoplasma foi necessário usar etanol ou isopropanol a 70% (V/V) e hipoclorito de sódio (NaClO, lixívia). Equipamento de proteção pessoal (bata, luvas e touca) é essencial, assim como uma câmara de segurança microbiológica (CSM). Foram usadas soluções de PBS (do inglês, *phosphate buffer solution*) sem cálcio nem magnésio, tripsina (TrypLE), azul tripano a 0,4% em solução salina, meio de cultura pré-aquecido a 37°C, PBS contendo cálcio e magnésio e, ainda, solução de resazurina em PBS com 0,2 mg/mL. Em relação ao equipamento, além da CSM, foi necessário uma incubadora de CO₂, microscópio invertido com contraste de fase, centrífuga, hemocítmetro, pipetas e pontas para micropipetas.

3.5.2. Método experimental

Antes de iniciar o procedimento experimental, foram pesados 150 mg de cada amostra de hidroxiapatite dopada com as diferentes quantidades de ferro ($x = 0, 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), sinterizadas a 700°C . Os diversos pós a analisar foram inseridos numa estufa a 120°C durante 2 horas de modo a eliminar qualquer contaminação microbiana ou fúngica. Antes e depois do trabalho experimental foi essencial desinfetar a superfície de trabalho da CSM pulverizando-a com álcool 70% (V/V), assim como todos os materiais e equipamentos manuseados no interior da câmara seguindo uma técnica asséptica. O meio de cultura deve ser descartado numa solução de lixívia a 1% e deixado no interior da CSM durante 2 horas após o que pode ser descartado juntamente com água abundante.

O primeiro passo dos testes de citotoxicidade foi a preparação do extrato a 37°C durante 2 dias. Adicionaram-se $1500\ \mu\text{L}$ de meio de cultura (Meio Eagle Modificado de Dulbecco suplementado com 10% de soro bovino fetal) a cada amostra de 150 mg de pó.

Em segundo lugar procedeu-se à preparação da sementeira celular, isto é, a passagem de células Vero do T25 (frasco celular) para uma placa de poços com os materiais produzidos e assim semear as células sobre eles. Inicialmente removeu-se o meio de cultura com uma pipeta e lavou-se a camada de células com PBS sem cálcio nem magnésio usando um volume igual ao do meio de cultura usado. Para realizar a passagem das células para a placa de cultura, as células devem ser soltas do substrato e colocadas em suspensão, usando uma protease (a tripsina) para cortar as ligações das células ao substrato. Foram pipetados cerca de $0,5\ \text{mL}$ de tripsina por cada $25\ \text{cm}^2$ de área de cultura. De seguida, o frasco de cultura foi incubado a 37°C durante 6 minutos. Após esse tempo procedeu-se à contagem das células a partir de 50 a $100\ \mu\text{L}$ de suspensão de células misturados com igual quantidade de azul tripano (fator de diluição 2). Usou-se um hemocítmetro enchendo as duas câmaras de contagem com a suspensão celular (cerca de 8 a $10\ \mu\text{L}$ em cada câmara) e observou-se num microscópio invertido com contraste de fase, usando uma ampliação de $10\times$. A concentração de células viáveis (pequenas esferas brilhantes), isto é, número de células por mililitro, pode ser obtida pela Equação 3.6 [49].

$$C_{\text{células}} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células viáveis contadas}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrados com } 1\ \text{mm de lado contados}} * \text{diluição} * 10000 \quad \text{Equação 3.6}$$

Foi obtida uma concentração de 38k células por mililitro, pelo que se adicionou $15,8\ \text{mL}$ de meio fresco a $2,5\ \text{mL}$ de células em suspensão num novo tubo de modo a obter a quantidade de células adequada, $20\text{k células}/\text{cm}^2$. O meio com células foi transferido para duas placas de cultura de 96 poços, tendo sido usados 158 poços no total, cada um com $0,3\ \text{cm}^2$ de área e $100\ \mu\text{L}$ de capacidade. De seguida, as placas foram mantidas na incubadora.

Após 24 horas procedeu-se à extração, isto é, foi retirado o meio e acrescentados os materiais sintetizados de HAp nos respetivos poços. Foram feitas 4 diluições (fator de 2) de cada amostra com diferentes quantidades de ferro e 5 réplicas de cada uma. Por fim, incubou-se, novamente, as placas por um período de 48 h.

Para a determinação da viabilidade celular pelo método da resazurina, procedeu-se à aspiração dos poços e a uma lavagem dos mesmos, desta vez com PBS contendo cálcio e magnésio, de forma a remover a totalidade dos pós. De seguida, adicionaram-se 100 μ L de meio com 10% de resazurina a cada poço e, findo um período de incubação da placa de 2 h, procedeu-se à medição da absorvância do meio contido nos poços a 570 e a 600 nm [50].

Foram usadas células controlo, controlo negativo, controlo positivo e controlo de meio, as quais foram mantidas nas mesmas condições que as células testadas, sem a adição dos pós de HAp pura e dopada.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização

A Figura 4.1: Comparação visual entre os pós de HAp pura (A) e com quantidades de Fe^{3+} incorporadas iguais a $x = 0,25$ (B), $x = 0,5$ (C), $x = 1$ (D), $x = 2$ (E), $x = 3$ (F) e $x = 5$ (G), sinterizados a 700°C durante 1 h. permite comparar visivelmente os nanopós de HAp pura ($x = 0$) e com quantidades de Fe^{3+} incorporadas iguais a $x = 0,25$; 0,5; 1; 2; 3 e 5. As amostras observadas foram, previamente, produzidas via sol-gel e sinterizadas a 700°C durante 1 hora. A partir da Figura 4.1 pode-se observar que com a inserção de ferro, as amostras tornaram-se acastanhadas e avermelhadas a partir de $x \geq 2$.



Figura 4.1: Comparação visual entre os pós de HAp pura (A) e com quantidades de Fe^{3+} incorporadas iguais a $x = 0,25$ (B), $x = 0,5$ (C), $x = 1$ (D), $x = 2$ (E), $x = 3$ (F) e $x = 5$ (G), sinterizados a 700°C durante 1 h.

4.1.1. Difração de raios-X

O padrão de difração é uma característica fundamental de um cristal, permitindo, não só, identificá-lo rapidamente, mas também, esclarecer por completo a sua estrutura.

Na Figura 4.2-A está representado o padrão de raios-X da amostra de hidroxiapatite pura, produzida por sol-gel e sinterizada a 600°C . O espectro mostra-se perfeitamente alinhado com o padrão da HAp da ficha número PDF#09-432 da base de dados JCPDS (*Joint Com-*

mittee on Powder Diffraction Standards), atualmente conhecida como ICDD (*International Centre for Diffraction Data*®). Nenhuma outra fase de fosfatos de cálcio, como o β -fosfato de tricálcio (β -TCP) ou o óxido de cálcio (CaO) foram detetados nesta análise. Os índices de Miller (hkl), que definem os planos cristalográficos que caracterizam a sequência periódica dos átomos do cristal, estão indicados na Figura 4.2.

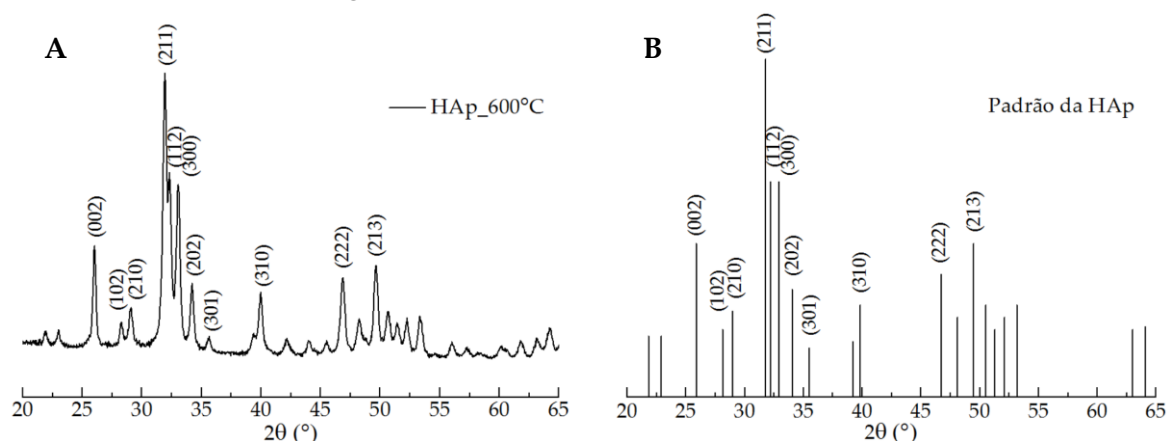


Figura 4.2: Comparação entre o espectro de difração de raios-X da HAp pura ($x = 0$) sinterizada a 600°C (A) e os principais picos de difração referentes à HAp retirados da ficha JCPDS #09-0432 (B).

A cristalinidade de um material está relacionada com a intensidade e largura dos picos de difração de raios-X. Assim, materiais com picos intensos e estreitos têm maior cristalinidade do que amostras que apresentem picos de DRX largos e de baixa intensidade. Também a formação de cristalitos de tamanho reduzido provoca o alargamento dos picos de difração [16]. Posto isto, ao observar os espectros da Figura 4.3 (A, B e C), obtidos após tratamento térmico a 600°C, 700°C e 800°C durante 1 hora, conclui-se que a inserção de Fe^{3+} na estrutura de hidroxiapatite leva à formação de material menos cristalino e com defeitos de rede.

Em relação à temperatura de sinterização do pó obtido, esta pode alterar a fase presente na amostra, pois cada uma das fases dos fosfatos de cálcio apresenta diferentes estabilidades térmicas e propriedades físicas. Uma pequena variação na razão Ca/P do pó produzido resulta numa grande variação das proporções das fases formadas após a sinterização [16].

Através da análise dos espectros de difração da Figura 4.3, pode-se afirmar que a HAp se começa a decompor quando sinterizada a 800°C. A esta temperatura (Figura 4.3-C) observa-se claramente a presença de pelo menos três novos picos nas amostras com $x \leq 1$. Estes correspondem aos picos de β -TCP (fosfato de tricálcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) da base de dados JCPDS, PDF#09-0169 (resultado confirmado pelo *software High Score Plus*). Fathi *et al.* [9] referiram o aparecimento de β -TCP e CaO (óxido de cálcio) quando a hidroxiapatite produzida via sol-gel foi sinterizada a 700°C. Por outro lado, Kaygili *et al.* [41] descreveram a formação de compósitos de HAp e β -TCP em todas amostras de HAp pura e dopada com Fe (sinterizadas a 800°C), aumentando a quantidade de β -TCP com o aumento da incorporação de ferro.

Os picos de difração do β -TCP, exceto para $x = 0$, apresentam um desvio para ângulos de difração maiores quando comparados com os valores da base de dados JCPDS. Segundo Miyaji *et al.* [51], o desvio mencionado indica que a substituição de Ca por Fe na HAp desenvolveu-se em substituição no β -TCP, após sinterização a 800°C.

A Figura 4.3 mostra que os picos característicos da estrutura de hidroxiapatite são observados apenas para as amostras com $x \leq 1$ para as três temperaturas de sinterização (600°C, 700°C e 800°C). Relativamente a estas composições pode-se afirmar que existe dopagem da rede cristalina de hidroxiapatite, existindo uma substituição dos iões Ca^{2+} pelos iões Fe^{3+} , pois todos os picos apresentados nas amostras $x = 0,25; 0,5$ e 1 têm correspondência direta com os picos da HAp pura ($x = 0$).

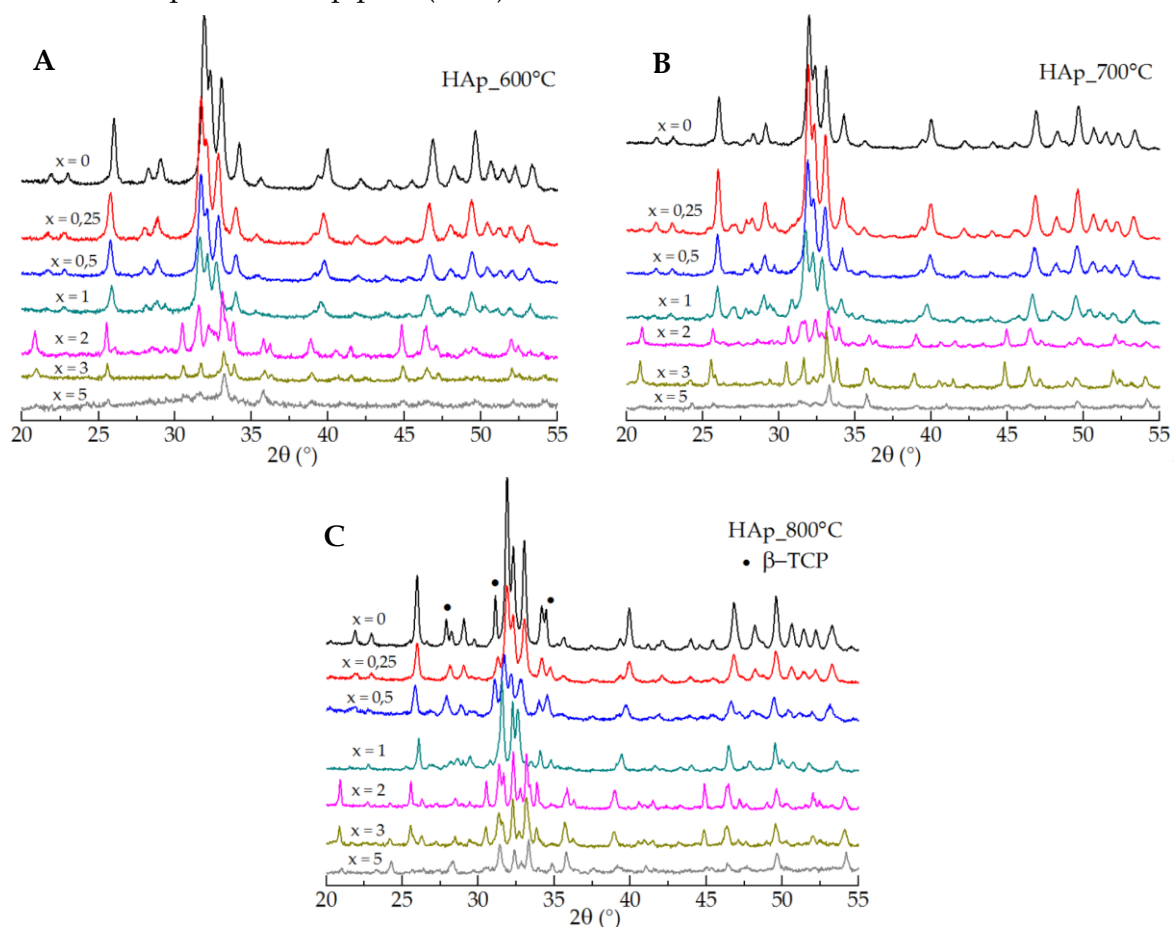


Figura 4.3: Comparação entre os espectros de difração de raios-X da HAp pura ($x = 0$) e dopada com diferentes quantidades de Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), sinterizada a 600°C (A), 700°C (B) e 800°C (C) durante 1h.

A série de amostras $x = 0; 0,25; 0,5$ e 1 , sinterizada a 700°C, mereceu uma análise com maior detalhe. Através do programa de visualização de medidas de DRX, *Data Viewer*, torna-se bastante evidente que, com o aumento do valor de x , aumenta o fundo de fluorescência de raios-X, apontando para um aumento da presença de Fe na estrutura. Além disso, é também

perceptível um pequeno desvio dos picos de DRX para ângulos de difração menores com o aumento da quantidade de Fe^{3+} , o que pode ser justificado pela dopagem da rede cristalina.

Os espectros das amostras com $x \geq 2$ apresentam a formação de novos picos de difração, indicando o aparecimento de novos compostos. Além disso, o desaparecimento dos picos característicos da HAp sugere uma alteração significativa da composição cristalina. Relativamente às amostras com $x = 5$, torna-se difícil visualizar os picos de difração, o que pode ser devido ao elevado fundo de fluorescência de raios-X que encobre os picos destas amostras.

Com o intuito de perceber quais os compostos químicos presentes nestas amostras, os espectros de DRX foram analisados com recurso ao *software High Score Plus*. Foi usada a base de dados ICDD no algoritmo de pesquisa / correspondência para identificação de fases. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Compostos químicos presentes nas amostras com $x=2, 3$ e 5 , sinterizadas a 600°C , 700°C e 800°C

		Nome do composto	Fórmula química	Código ICDD
$x = 2$	600°C	Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
		Cloroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	00-001-1011
	700°C	Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
		Cloroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	00-001-1011
	800°C	Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
		Cloroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	00-001-1011
$x = 3$	600°C	Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
	700°C	Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
		Hematite	Fe_2O_3	01-079-1741
	800°C	Hematite	Fe_2O_3	01-079-1741
		Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
		Cloroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	00-001-1011
$x = 5$	600°C	Hematite	Fe_2O_3	01-079-1741
		Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
	700°C	Hematite	Fe_2O_3	01-079-1741
		Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
	800°C	Hematite	Fe_2O_3	01-079-1741
		Fosfato de tetracálcio substituído por cloro	$\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$	00-019-0247
		Cloroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	00-001-1011

A presença de hematite (óxido de ferro, Fe_2O_3) nas amostras justifica a cor avermelhada dos pós (ver Figura 4.1). A amostra com $x = 2$ não apresenta hematite neste estudo, o que pode ser explicado pelo facto de os picos característicos deste composto ($2\theta = 33,2^\circ$; $35,5^\circ$ e $54,0^\circ$) poderem estar encobertos pelos picos de difração do fosfato de tetracálcio substituído por cloro (TTCP, $\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$). Segundo Šupová [11] a cloroapatite pura não pode ser um bom biomaterial porque a substituição total dos grupos hidroxilo por iões cloro irá aumentar a acidez do ambiente local, levando à rápida solubilização de sais alcalinos. O teor de cloro no osso natural pode ser de até 0,13% em peso, enquanto na cloroapatite pura o teor é de 6,8% em peso. A HAp (ClHAp) substituída com cloreto é, portanto, mais adequada para aplicações biomédicas.

Kyriacou *et al.* [14] identificaram apenas a fase de HAp nas amostras produzidas por precipitação com $x \leq 0,1$, enquanto a hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) foi identificada nas amostras com $x \geq 0,2$. Trinkunaite-Felsen *et al.* [40] detetaram o aparecimento de CaO em amostras de HAp sinterizadas a 800°C e dopadas com 0,01-0,5 %mol de Fe (intervalo não abrangido pelas amostras em estudo, ver Tabela 3.1). Nas amostras com 2-5 %mol de Fe observou-se HAp pura com elevada cristalinidade. No entanto, é formada uma mistura de diferentes componentes, tais como, HAp, $\beta\text{-TCP}$, Fe_2O_3 e CaO nas amostras com 5 e 10 %mol de Fe.

Gomes *et al.* [39], através da análise *Rietveld*, detetaram a presença de $\beta\text{-TCP}$ aos 600°C em todas as amostras produzidas ($x = 0$; 0,15; 0,25; 0,50 e 0,75). Além disso, impurezas como $\alpha\text{-CDP}$ (difosfato de cálcio, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) e $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematite) foram encontradas nas amostras dopadas com Fe. O composto $\alpha\text{-CDP}$ surgiu até 700°C e $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ depende da incorporação de Fe, aparecendo nas amostras com $x \geq 0,25$. A quantidade máxima de hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ocorreu aos 1000°C , sofrendo uma redução acentuada aos 1100°C , o que indica que os átomos de Fe só foram realmente incorporados na estrutura de HAp aos 1100°C .

Por outro lado, as amostras produzidas por Kaygili *et al.* [41] via sol-gel e sinterizadas a 800°C apresentaram picos de difração apenas de HAp e $\beta\text{-TCP}$ sem o aparecimento de uma terceira fase. Chandra *et al.* [44] produziram amostras de HAp dopadas com Fe^{3+} via hidrotermal e micro-ondas, as quais não revelaram fases secundárias além da de hidroxiapatite. Da mesma forma, Wu *et al.* [46] não detetaram picos de difração nas amostras produzidas por coprecipitação diferentes dos picos de HAp. Os autores referem que ocorreu apenas o desaparecimento de alguns dos picos de difração da HAp e uma inversão de intensidades em que o pico (300) tornou-se mais intenso que os picos (211) e (112). Low *et al.* [43] sinterizaram as amostras produzidas por precipitação sob atmosfera de azoto referindo que a sinterização no ar é inapropriada na medida em que desenvolve uma mistura de apatite com hematite (Fe_2O_3).

4.1.1.1. Diâmetro de cristalito

O diâmetro de cristalito (D_c) representa o tamanho do domínio no qual uma partícula do pó tem uma estrutura cristalina que difrata coerentemente [16]. A estimativa do diâmetro do cristalito de cada uma das amostras é calculada pela fórmula de Scherrer (Equação 3.1) a partir da largura a meia altura do pico de difração (002), pois este é o pico isolado com maior intensidade do espectro. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Analizando os valores da Tabela 4.2, parece haver uma tendência decrescente do diâmetro de cristalito nas amostras dopadas com $x \leq 1$. De acordo com Trinkunaite-Felsen *et al.* [40] e Kaygili *et al.* [41] a redução do tamanho de cristalito e um pequeno desvio na posição dos picos indicam que o dopante Fe^{3+} (raio iônico igual a 0,64 Å) substitui o Ca^{2+} (raio iônico igual a 0,99 Å). Batista *et al.* [16] também referem que o efeito da inserção de Fe^{3+} resulta numa redução do diâmetro dos cristalitos de HAp, aferindo que a proximidade dos resultados com a HAp pura ($x = 0$) está relacionada com o sítio de Ca^{2+} ocupado pelos íons. Os íons de Fe^{3+} ocupam os locais de Ca(1), o que provoca menos alterações na estrutura do material, pois o sítio Ca(1) é menos distorcido que o sítio Ca(2).

Segundo Fathi *et al.* [9] e Kuriakose *et al.* [26] é esperado maior diâmetro para temperaturas de sinterização mais elevadas, o que vai ao encontro dos resultados obtidos apenas para HAp pura. Para as restantes amostras os valores não seguem uma evolução linear com a temperatura. Ao analisar os espectros de DRX para diferentes temperaturas observa-se um aumento da intensidade dos picos com o aumento da temperatura, indicando um crescimento dos planos cristalográficos.

Tabela 4.2: Valor do diâmetro de cristalito associado a cada amostra de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe ($x = 0,25$; 0,5 e 1) para cada temperatura de sinterização

	$x = 0$	$x = 0,25$	$x = 0,5$	$x = 1$
D_c (600°C) (nm)	28	26	23	29
D_c (700°C) (nm)	29	29	28	27
D_c (800°C) (nm)	35	29	28	45

4.1.1.2. Cristalinidade

A percentagem de cristalinidade (X_c) da HAp pode ser obtida com recurso à Equação 4.1, onde I_{300} é a intensidade do pico de difração (300) e $V_{112/300}$ é o vale entre os picos de difração (112) e (300) da HAp.

$$X_c = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \quad \text{Equação 4.1}$$

Os valores do grau de cristalinidade das amostras de HAp pura ($x = 0$) e dopada com $x = 0,25$; $0,5$ e 1 produzidas por sol-gel são apresentados na Tabela 4.3.

Como já foi referido na análise dos espectros de DRX, é esperada uma diminuição da cristalinidade com a inserção de iões Fe^{3+} . A partir da Tabela 4.3 verifica-se que para as amostras dopadas existe uma redução da cristalinidade com o aumento de x nominal. Esta evidência pode ser devida ao facto do raio iónico do Fe^{3+} ($0,64 \text{ \AA}$) ser menor que o do Ca^{2+} ($0,99 \text{ \AA}$), o que inibe a formação de HAp [51].

Em relação às temperaturas de sinterização, de 600°C para 700°C , observa-se um aumento da cristalinidade em todas as amostras, tal como foi previsto por Fathi *et al.* [9]. No entanto, para 800°C os resultados de cristalinidade não são lineares, havendo um aumento nas amostras com $x = 0$; $0,25$ e uma descida para as amostras com $x = 0,5$ e 1 .

Tabela 4.3: Percentagem de cristalinidade das amostras de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe ($x = 0,25$; $0,5$ e 1) para cada temperatura de sinterização

	$x = 0$	$x = 0,25$	$x = 0,5$	$x = 1$
$X_c (600^\circ\text{C})$	74%	66%	65%	54%
$X_c (700^\circ\text{C})$	81%	71%	68%	58%
$X_c (800^\circ\text{C})$	85%	74%	53%	50%

4.1.1.3. Parâmetros de rede

A variação dos parâmetros de rede da HAp fornece indicações sobre o mecanismo de dopagem de ferro na estrutura. O cálculo dos parâmetros de rede da estrutura cristalina é feito com recurso à Lei de Bragg (Equação 3.2) e, em segundo lugar, recorrendo à expressão correspondente ao sistema hexagonal (Equação 3.3). Segundo a ficha PDF#09-432 da base de dados JCPDS, os valores teóricos dos parâmetros de rede a e c da HAp são $0,9418 \text{ nm}$ e $0,6884 \text{ nm}$, respetivamente.

A Figura 4.5 (A e B) permite uma análise imediata da evolução dos parâmetros de rede das amostras de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe^{3+} ($x = 0,25$; $0,5$ e 1), sinterizadas a 600°C , 700°C e 800°C , durante 1h. A Tabela A.1 em apêndice apresenta os valores exatos dos parâmetros de rede obtidos. Analisando a figura, observa-se uma evolução inconstante dos parâmetros de rede com a inserção de Fe^{3+} , dependendo da temperatura de sinterização. As amostras de HAp sinterizadas a 600°C sofrem uma diminuição dos parâmetros a e c com a inserção mínima de Fe ($x = 0,25$), mas o mesmo não acontece a 700°C nem a 800°C . Apesar disso, com o aumento da quantidade de Fe^{3+} (maior x nominal) o valor do parâmetro a

aumenta nitidamente em todas as temperaturas de sinterização. Por outro lado, o parâmetro c apresenta um comportamento oscilante.

As mudanças nos parâmetros de rede e volume da célula unitária geralmente estão relacionadas com o tamanho do raio iônico do catião quando comparado com o do Ca^{2+} . A substituição do cálcio (raio iônico igual a 0,99 Å) por um catião menor, como o Fe^{3+} (0,64 Å), resulta na contração dos parâmetros a e c da célula unitária [16][44]. Pelo mesmo motivo, os resultados de Kyriacou *et al.* [14] revelaram que ambos os parâmetros de rede são menores nas amostras dopadas ($x = 0,05; 0,1; 0,2; 0,3$) do que nas amostras sem Fe. Apesar disso, os mesmos autores referiram que o parâmetro a aumenta com x nas amostras dopadas, o que está de acordo com os resultados da Figura 4.5-A. Esta subida pode ser justificada pelos locais geométricos Ca(1) e Ca(2) e as possíveis configurações geométricas dos íons de Fe. A ligação interatômica Ca(1)–O(3) (ver Figura 2.1) é quase perpendicular ao eixo c o que significa que um aumento do comprimento de ligação com a quantidade de Fe (x) resulta num aumento do parâmetro a (plano a - b) [14] como é observado na Figura 4.5-A. Do mesmo modo, Low *et al.*[43] descreveram um aumento anisotrópico do parâmetro a com o aumento de Fe, com uma descontinuidade na amostra $x = 0,2$ (onde ocorre a transformação de apatite carbonatada para oxapatite), e uma diminuição do parâmetro c , nas amostras sinterizadas a 600°C. Isto acontece porque para $x = 0,1$ o Fe ocupa na totalidade o sítio Ca(1), mas para $x = 0,25$ o ferro é estatisticamente distribuído pelos dois locais do cálcio.

Na Figura 4.4 pode-se observar a localização geométrica da substituição de Ca por Fe^{3+} no sítio Ca(1) descrita por Kyriacou *et al.* [14].

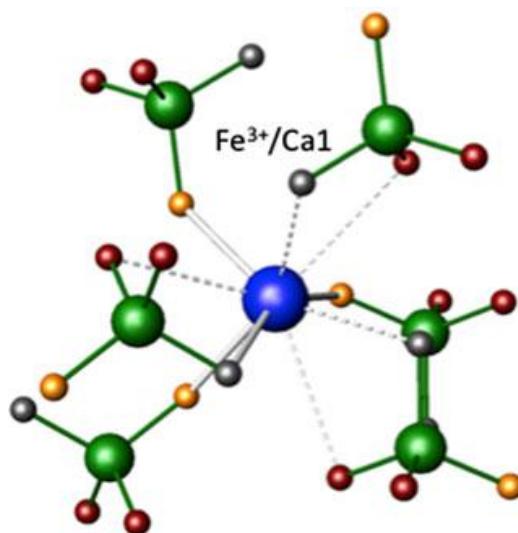


Figura 4.4: Localização geométrica da substituição por Fe^{3+} no sítio Ca(1). Os átomos vizinhos mais próximos são três O(1) (laranja) e um O(2) (cinza). As linhas tracejadas marcam as ligações quebradas [14].

Em oposição, Kaygili *et al.* [41] (após sinterização a 800°C) descreveram um pequeno aumento de ambos os parâmetros de rede (a e c) com o aumento da quantidade de Fe, com valores muito próximos aos valores *standard*.

Gomes *et al.* [39] e Renaudin *et al.* [36] provaram que apenas para a temperatura de sinterização de 1100°C ocorre uma variação drástica e anisotrópica dos valores dos parâmetros a e c . A contração do parâmetro a e a expansão acentuada do parâmetro c com a quantidade de Fe podem ser justificadas pelo local de inserção do catião Fe^{3+} na zona intersticial da estrutura da HAp. Entre 500°C e 1000°C observaram-se apenas pequenas variações nos valores. Apesar disso, para as temperaturas de 600°C, 700°C e 800°C os resultados estão em concordância com os obtidos na Figura 4.5. Os autores detetaram que o parâmetro a aumentou com a temperatura, exceto para a amostra não dopada ($x = 0$), e o parâmetro c sofreu uma diminuição aos 800°C. Em relação à evolução dos parâmetros de rede com a quantidade de Fe incorporada esta não é linear para as temperaturas de sinterização estudadas. No entanto, existiu uma ligeira diminuição do parâmetro a nas amostras dopadas que pode ser atribuída a um mecanismo de substituição de cálcio a 500°C e 600°C.

A variedade de alterações relatadas nos parâmetros de rede com a inserção de Fe na rede da HAp pode estar associada aos parâmetros de síntese de todas as amostras, bem como à capacidade de análise dos difratogramas obtidos. A mínima variação na síntese pode causar grandes diferenças nos valores dos parâmetros de rede calculados [14].

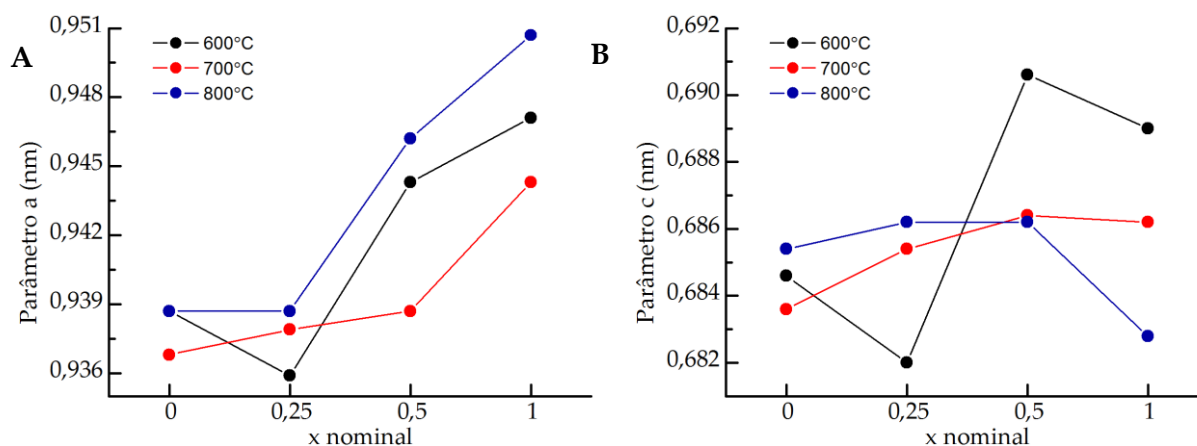


Figura 4.5: Evolução dos parâmetros de rede a (A) e c (B) das amostras de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5$ e 1) sinterizada a 600°C, 700°C e 800°C durante 1h.

4.1.2. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

Com o objetivo de verificar a presença dos grupos funcionais da HAp procedeu-se à análise dos espectros de infravermelho por transformada de Fourier obtidos para os pós em estudo ($x = 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), sinterizados a 600°C, 700°C e 800°C. Os espectros encon-

tram-se representados na Figura 4.6 com a respetiva identificação dos modos de vibração FTIR característicos da HAp estequiométrica (Figura 4.6-D).

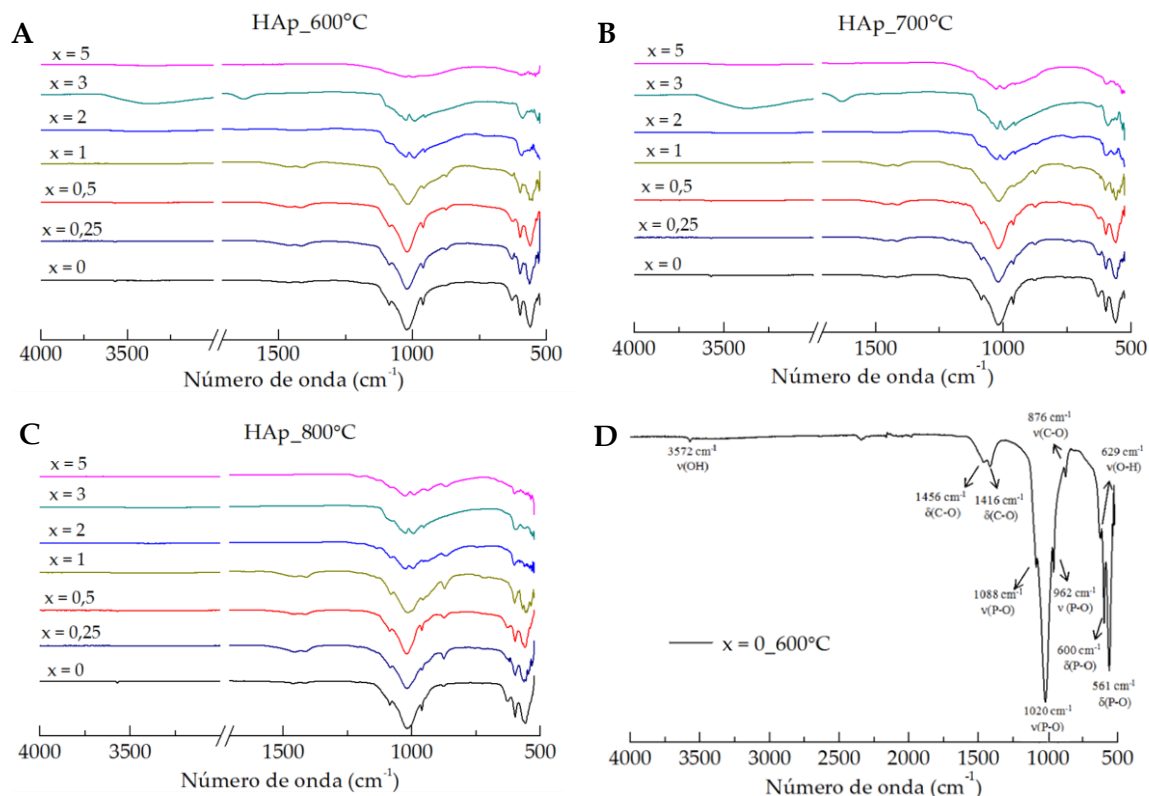


Figura 4.6: Espectros de FTIR das partículas de HAp pura ($x = 0$) e com diferentes quantidades de Fe^{3+} ($x = 0,5, 2, 3$ e 5) sinterizadas a 600°C (A e D), 700°C (B) e 800°C (C) durante 1 h.

De uma forma geral, pode-se concluir que não foram encontradas alterações significativas entre as três temperaturas de sinterização [37][26]. Além disso, o espectro da análise FTIR indica que não existem diferenças entre a HAp pura ($x = 0$) e dopada com $x = 0,25; 0,5$ e 1 , provando que a substituição de iões na HAp mantém a sua composição química, idêntica à da HAp convencional. No entanto, as bandas específicas das apatites diminuíram de intensidade com o aumento da incorporação Fe^{3+} , ou seja, com o aumento de x nominal. De acordo com Trinkunaite-Felsen *et al.* [40], a percentagem da fase apatite diminui para as amostras com maior quantidade de Fe, neste caso as amostras com $x = 2, 3$ e 5 .

Nas amostras com $x \geq 1$, as três bandas de deformação axial do grupo fosfato, PO_4^{3-} , (962 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} e 1088 cm^{-1}), assim como as referentes à deformação angular (561 cm^{-1} e 600 cm^{-1}), tornaram-se imprecisas, assim como no estudo de Miyaji *et al.* [51]. Estas alterações nos espectros, incluindo a separação da banda de deformação axial a 1020 cm^{-1} (PO_4^{3-}) em duas outras bandas (993 cm^{-1} e 1024 cm^{-1}) sugerem uma diminuição da cristalinidade e a formação de um novo composto no lugar da HAp, apoiando os resultados obtidos por DRX.

A análise FTIR mostrou que quando a incorporação de Fe^{3+} é inexistente ou muito baixa, menor ou igual a $x = 1$, as amostras contêm carbonato, CO_3^{2-} , (banda de deformação axial a 876 cm^{-1} , e de deformação angular a 1416 cm^{-1} e 1456 cm^{-1}) introduzido pela absorção de dióxido de carbono atmosférico ou devido a impurezas de CaCO_3 contidas nos reagentes [21][26]. Acima de $x = 1$ as pequenas bandas referentes ao grupo carbonato e ao grupo hidróxido, OH^- , da HAp (deformação axial em 629 cm^{-1} e 3572 cm^{-1}) desapareceram. Segundo *Low et al.* [43] o íon Fe^{3+} foi incorporado juntamente com o oxigênio intersticial (O^{2-}) nestas amostras.

Após sinterização a 600°C e 700°C , as amostras $x = 3$ e $x = 5$ foram submetidas a uma temperatura de 105°C em vácuo (-40 cmHg) durante 10 horas. O tratamento de secagem foi eficaz para a amostra $x = 5$, tendo sido evaporado qualquer vestígio de água que poderia ter sido absorvida pela amostra após sinterização. No entanto, além das bandas características da HAp apresentadas na Figura 4.6-D, a amostra $x = 3$, sinterizada a 600°C e a 700°C , continuou a exibir duas bandas reveladoras da absorção de água. Uma banda bastante ampla centrada a 3363 cm^{-1} e outra a 1633 cm^{-1} , correspondentes à deformação axial e angular, respectivamente, da água líquida (H_2O).

4.1.3. Análise térmica diferencial e termogravimétrica

Com o propósito de compreender o comportamento das partículas de HAp pura ($x = 0$) e magnética ($x = 0,25; 0,5; 1$ e 2) quando submetidas a um aumento de temperatura, as mesmas foram sujeitas a uma análise térmica iniciada a 25°C e finalizada a 1050°C . Esta análise permite retirar conclusões sobre as temperaturas mais favoráveis de sinterização. A Figura 4.7 (A e B) apresenta as curvas de TGA, que representam a perda de massa das amostras com a subida de temperatura, e de DTA, as quais exibem os picos derivativos das curvas de TGA, evidenciando as reações e transformações de fase que motivam as perdas de massa.

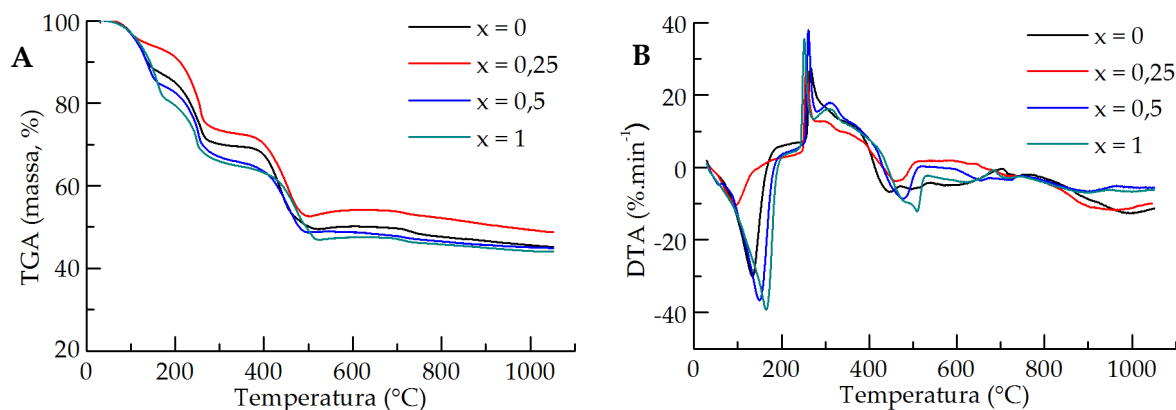


Figura 4.7: Curvas de TGA (A) e DTA (B) das partículas de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe^{3+} ($x = 0; 0,25; 0,5; 1$).

Observando as curvas da Figura 4.7 pode-se concluir que todas as amostras analisadas sofrem essencialmente três perdas de massa, o que se reflete em 3 picos derivativos nas curvas de DTA. Os valores de temperatura, retirados das curvas de DTA, a que ocorrem as reações, e as perdas de massa correspondentes estão apresentados na Tabela 4.4.

A baixas temperaturas ($\sim 150^\circ\text{C}$), o solvente, normalmente água adsorvida na superfície das partículas de apatite, evapora, provocando a primeira perda de massa e a reação endotérmica evidenciada pelo primeiro pico negativo da curva de DTA. Por sua vez, a temperaturas acima dos 250°C , a rede molecular decompõe-se por pirólise (ruptura da estrutura molecular original por ação do calor), ocorrendo libertação de compostos voláteis, como o NO_3^- , responsáveis pela segunda perda de massa. Acima de 800°C os resíduos orgânicos são removidos por descarboxilação [52]. Na análise térmica de Agrawal *et al.* [25] de HAp pura produzida via sol-gel, foram detetadas pequenas curvas endotérmicas seguidas de uma outra mais acentuada a 270°C o que é atribuído à evaporação da água contida no nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Da mesma forma, os outros picos endotérmicos encontrados na curva de DTA relacionam-se com a remoção ou adição de outros grupos durante a síntese de pó de HAp. Os mesmos autores referem que o pico exotérmico a 200°C indica a cristalização da HAp.

A perda de massa e o pico endotérmico visíveis entre 750°C e 850°C indicam a decomposição da apatite e formação de TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) [51], apoiando os resultados da análise de DRX das amostras sinterizadas a 800°C .

Tabela 4.4: Temperatura dos picos derivativos e perdas de massa das amostras de HAp pura e dopada com Fe^{3+} ($x = 0; 0,25; 0,5$ e 1)

Amostra	1ª perda de massa		2ª perda de massa		3ª perda de massa		Perda total de massa (%)
	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Perda de massa (%)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Perda de massa (%)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Perda de massa (%)	
$x = 0$	133,2	9,2	265,9	28,1	496,5	49,7	54,9
$x = 0,25$	95,3	2,7	256,2	21,8	457,8	42,7	51,3
$x = 0,5$	149,6	13,5	260,8	30,0	476,7	49,6	55,1
$x = 1$	164,6	16,2	251,6	30,6	508,9	52,2	56,0

4.1.4. Magnetometria de amostra vibrante

A Figura 4.8 apresenta as curvas de magnetização das NPs de HAp dopada com Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5) sinterizadas a 700°C , em função do campo magnético aplicado. Como está explicado no capítulo 2.2.1, a histerese aparece devido a barreiras ao campo magnético, como impurezas ou a anisotropia da rede cristalina. Quando o campo é levado a zero, a magnetização não se anula, apresentando uma magnetização remanescente, M_R . Para rever-

ter esta magnetização, é necessário aplicar um campo magnético em direção oposta ao campo anteriormente aplicado chamado de campo coercivo ou coercividade (H_c) (Figura 2.4). Posto isto, é necessário perceber se as amostras apresentam coercividade à temperatura ambiente, de modo a classificá-las como ferromagnéticas ($H_c > 0$) ou superparamagnéticas ($H_c \approx 0$).

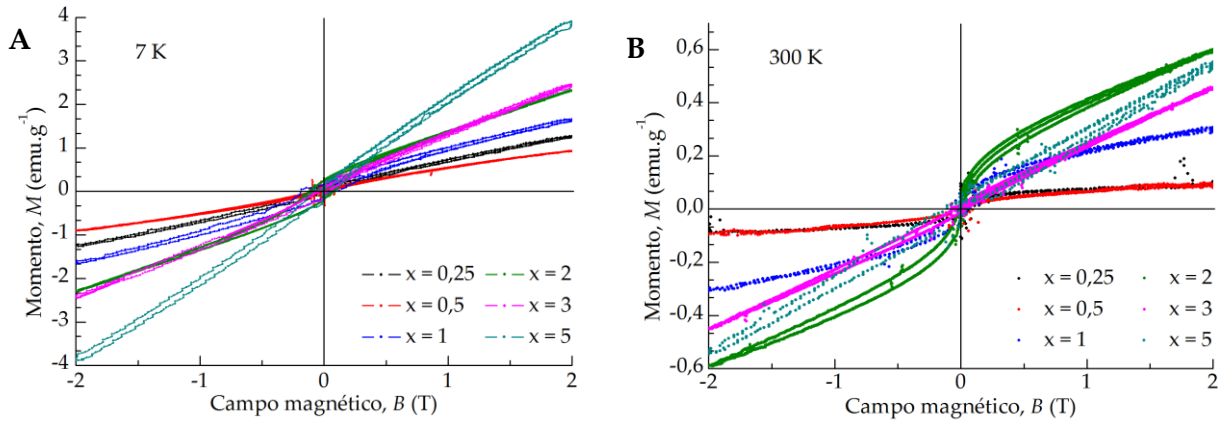


Figura 4.8: Curvas de magnetização das amostras de HAp com Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5) sinterizadas a 700°C , em função do campo magnético, medidas à temperatura de 7 K ($T < T_B$) (A) e de 300 K ($T_B < T < T_C$) (B).

As curvas da Figura 4.8 sugerem a presença de coercividade e remanência a 7 K , (Figura 4.8 - A), pois evidenciam uma abertura das curvas de magnetização provando o seu comportamento ferromagnético ($7\text{ K} < T_B$). Com o aumento da temperatura, a maioria das amostras sofre uma mudança da sua magnetização, sugerindo uma diminuição da coercividade a 300 K (Figura 4.8 - B). Este resultado pode ser verificado com maior detalhe a partir da Figura A.1, onde estão representadas as curvas de magnetização de cada uma das amostras individualmente a 300 K .

Posto isto, a 300 K ($= 26,85^\circ\text{C}$) os valores de coercividade sugerem que as amostras com $x \leq 2$ são superparamagnéticas à temperatura ambiente, na medida em que H_c é desprezável, pelo que $T_B < 300\text{ K} < T_C$. Além disso, é possível verificar que a magnetização de saturação (M_{sat}) aumenta com x nominal até à amostra com $x = 2$, provando que há um aumento da incorporação de Fe na estrutura. Por outro lado, relativamente às amostras com $x > 2$, as curvas sugerem uma redução da magnetização e um comportamento ferromagnético, o que pode indicar que a temperatura de 300 K é inferior à T_B para as amostras $x = 3$ e $x = 5$. De facto, a hematite presente nestas amostras possui um comportamento antiferromagnético com uma T_N igual a 948 K [53].

Li *et al.* [21] investigaram as propriedades magnéticas da HAp pura e dopada com Fe^{3+} e concluíram que a HAp pura possui um comportamento diamagnético (curva de magnetização com declive negativo), ocorrendo uma transição magnética para paramagnetismo com a inserção de Fe na estrutura. Kyriacou *et al.* [14] também detetaram uma transição magnéti-

ca das amostras com Fe, podendo estas serem paramagnéticas ou superparamagnéticas. Os mesmos autores detetaram um pequeno ciclo de histerese nas amostras com mais quantidade de Fe, atribuído aos spins descompensados da hematite antiferromagnética, o que está de acordo com os resultados obtidos na Figura 4.8.

Chandra *et al.* [44] e Wu *et al.* [46] revelaram propriedades de superparamagnetismo nas amostras de HAp dopadas com Fe. No entanto, no estudo de Chandra *et al.* [44] algumas amostras apresentaram um ciclo de histerese assimétrico o que pode ser atribuído ao facto da distribuição de Fe^{3+} poder não ser uniforme.

4.1.5. Microscopia eletrónica de transmissão

Com o intuito de comparar a morfologia e os tamanhos das partículas produzidas, as amostras de HAp com $x = 0,5$ e $x = 2$, sinterizadas a 700°C , foram analisadas por TEM. As imagens adquiridas são apresentadas na Figura 4.9.

As imagens de TEM obtidas foram analisadas através do *software ImageJ*, o qual possibilitou o cálculo do tamanho médio das partículas sintetizadas via sol-gel. Uma mistura de nanopartículas irregulares em forma de bastonetes e esferas com dimensões desde 19 nm a 47 nm é observada nas imagens de $x = 0,5$ (Figura 4.9 - A e B). Enquanto o intervalo de tamanhos da amostra com $x = 2$ (Figura 4.9 - C e D) é limitado de 23 nm a 43 nm e com formas mais anisotrópicas o que sugere o desaparecimento de HAp. Apesar disso, o tamanho médio das partículas não se altera com o aumento da inserção de Fe [14], tendo-se obtido uma média de diâmetros igual a 30 nm, com desvios padrão de 6 e 5 para as amostras com $x = 0,5$ e $x = 2$, respetivamente. Este resultado é próximo do diâmetro obtido por Fathi *et al.* [9] (25 nm) para o tamanho das partículas de HAp produzida por sol-gel e sinterizadas a 600°C .

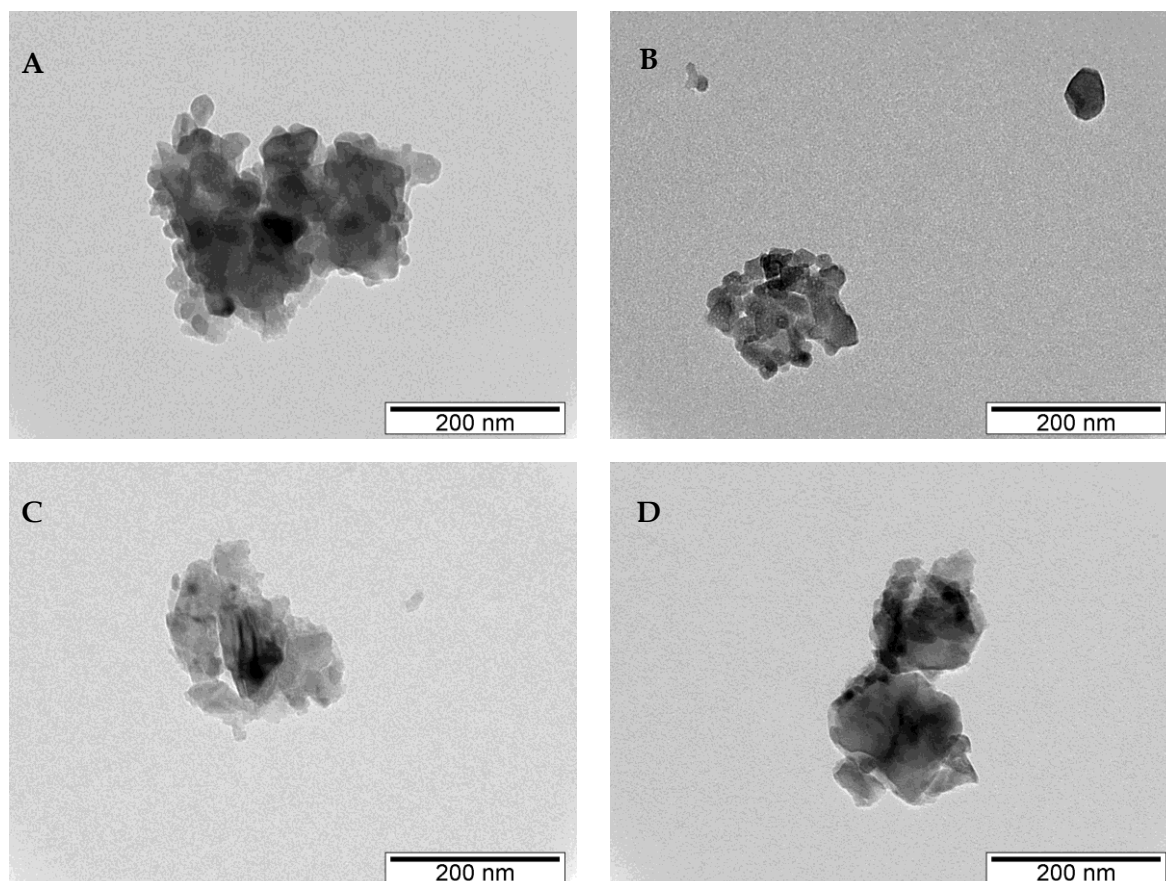


Figura 4.9: Imagens obtidas por TEM da amostra de HAp dopada com $x = 0,5$ (A e B) e da amostra de HAp com $x = 2$ (C e D), sinterizadas a 700°C .

4.2. Hipertermia Magnética

Os ensaios de hipertermia magnética foram realizados para avaliar a capacidade de geração de calor das nanopartículas produzidas de HAp pura ($x = 0$) e com incorporação de Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), sinterizadas a 700°C . Os resultados de subida de temperatura em função da amostra testada e respectivos desvios padrão são mostrados na Figura 4.10.

Observando a Figura 4.10, as nanopartículas com Fe, exceto a amostra com $x = 2$, aparentam ter uma subida de temperatura (ΔT) superior à das partículas de HAp pura ($x = 0$). No entanto, não existe uma evolução linear do aumento de temperatura com a quantidade de Fe^{3+} inserida o que sugere que o número de íons de Fe incorporado na estrutura de HAp não é proporcional à massa de reagente ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) introduzida no início da síntese. Além disso, a temperatura máxima obtida não é suficiente para os ensaios de hipertermia magnética pretendidos, em que a temperatura desejada é cerca de 41°C a 43°C . Em suma, as partículas de HAp com as quantidades de Fe^{3+} incorporadas, e produzidas por sol-gel, são ineficazes em ensaios de hipertermia magnética ou o intervalo de tempo de aplicação do campo magnético alternado ($= 10$ min) é insuficiente para o aumento de temperatura.

Hou *et al.* [35] estudaram *in vivo* a eficiência de aquecimento de nanopartículas de HAp dopada com íons Fe^{2+} , produzidas por precipitação, em ensaios de hipertermia magnética. Em oposição aos resultados obtidos na Figura 4.10, os autores atingiram uma temperatura entre 45°C e 46°C e mantiveram-na durante 20 minutos. Ao longo desse tempo, o interior do corpo do murganho não é afetado pela hipertermia aumentando apenas de 38°C para 40°C. O volume do tumor diminui rapidamente após injeção de partículas de HAp dopada com Fe misturadas em PBS (do inglês, *phosphate buffer solution*) e com aplicação de um campo magnético.

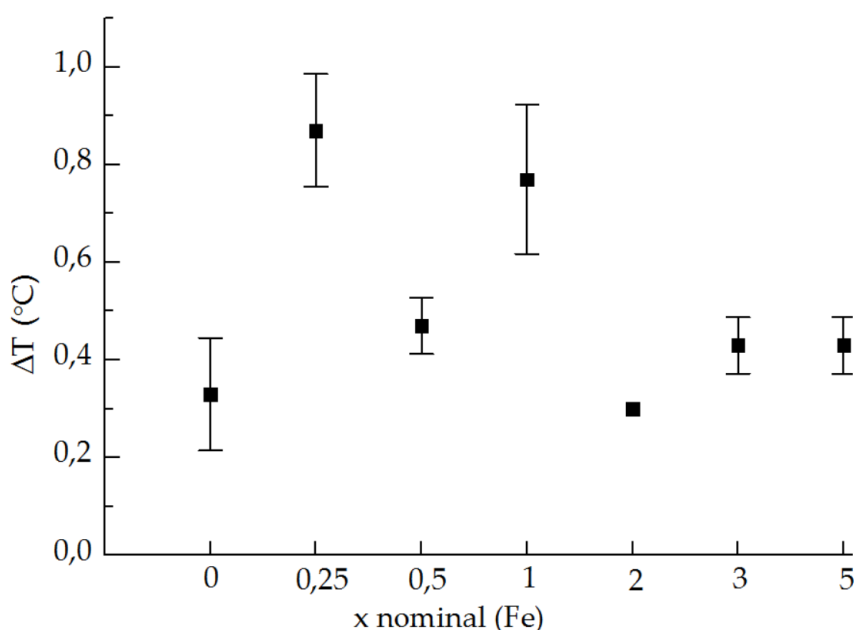


Figura 4.10: Aumento de temperatura gerado pelas partículas produzidas de HAp durante 10 minutos de aplicação de um campo magnético alternado com 24 kA.m^{-1} de intensidade e 418,5 kHz de frequência em função da quantidade de ferro inserida na estrutura de HAp ($x = 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3$ e 5).

4.3. Bioatividade

Após a realização dos testes de bioatividade com as amostras de $x = 0, 0,5$ e 2, tentou-se analisar a superfície das pastilhas testadas por SEM (*Scanning Electron Microscopy*), de modo a avaliar a formação de fosfatos de cálcio na zona externa.

No entanto, as pastilhas tinham um comportamento quebradiço mesmo após conclusão dos testes de bioatividade, o que impossibilitou a inserção destas no equipamento de microscopia eletrônica de varrimento. Em suma, não foi possível concluir acerca da bioatividade das amostras desenvolvidas, embora o aspeto esbranquiçado das pastilhas após tratamento em SBF possa indicar a presença de fosfatos de cálcio na face superior.

Contudo, Chandra *et al.* [44] mostraram a deposição de camadas de apatite na superfície das pastilhas de HAp pura e dopada com Fe^{3+} , tendo existido uma maior deposição nas

amostras dopadas. Também os estudos realizados por Ereiba *et al.* [45] revelaram que as amostras de HAp dopadas com ferro apresentam uma solubilidade e uma taxa de dissolução maior do que a amostra de HAp pura. Estes resultados provaram que o ferro aumenta a bioatividade da HAp *in vitro*, isto é, a capacidade de se unir diretamente ao osso e formar novo tecido ósseo após a implantação no tecido biológico.

4.4.Citotoxicidade

Uma das características mais importantes quando se fala de biomateriais é o seu nível de toxicidade. Neste estudo, foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* de modo a averiguar o efeito dos materiais desenvolvidos de HAp pura e com diferentes quantidades de ferro em células Vero. É adotado o método de extração, indireto, onde é previamente preparado o extrato com os pós produzidos, sobre os quais foram semeadas as células Vero.

A viabilidade celular, nas condições mencionadas, foi avaliada em relação à viabilidade do controlo de células (C-) através da razão entre a resazurina convertida nessas condições e a convertida no controlo, como indicado na Equação 4.2 (CM - controlo de meio).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(DO_{570} - DO_{600}) - (DO_{CM570} - DO_{CM600})}{(DO_{C-570} - DO_{C-600}) - (DO_{CM570} - DO_{CM600})} * 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

A conversão de resazurina em resorufina é proporcional ao número de células metabolicamente ativas e pode ser estimada através da subtração entre a absorvância medida a 570 nm, DO_{570} e a absorvância medida a 600 nm, DO_{600} . Para cada amostra testada é calculada a média desses valores a partir das cinco réplicas e respetivos desvios padrão. A incerteza associada (Δ) é calculada por propagação dos desvios padrão, Equação 4.3.

$$\Delta = \sqrt{\sigma^2 + \sigma_{CM}^2} \quad \text{Equação 4.3}$$

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 4.11, pode-se concluir que todos os pós produzidos de HAp pura ($x = 0$) e com diferentes quantidades de ferro inseridas ($x = 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5) apresentam o nível de citotoxicidade não-citotóxico, pois os resultados sugerem uma percentagem de viabilidade celular superior a 90%. Este resultado indica que os pós produzidos de HAp dopada com ferro não provocam efeitos tóxicos nos tecidos biológicos, tal como já tinha sido relatado na literatura.

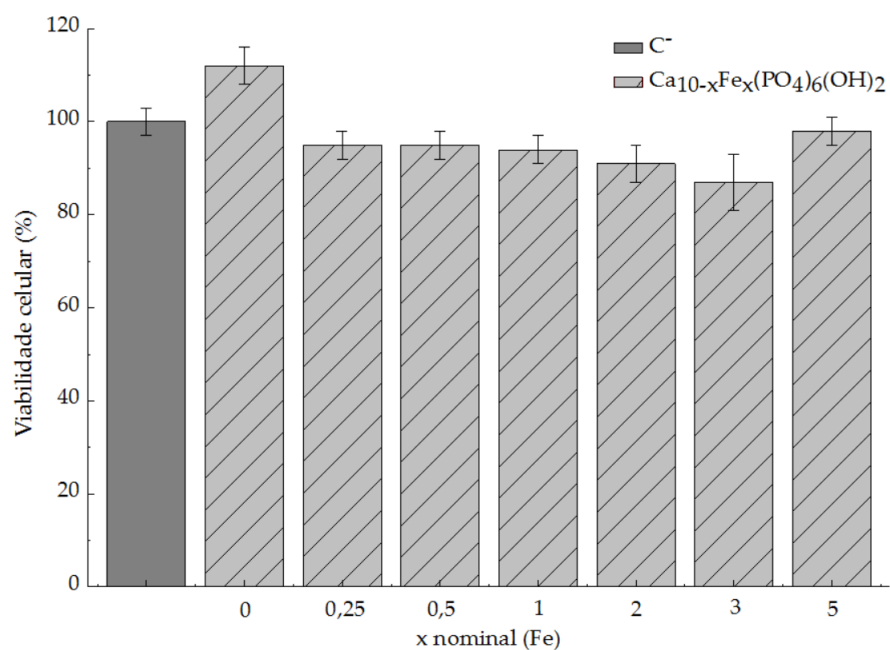


Figura 4.11: Viabilidade celular, em %, de células Vero após contato com as sete amostras de HAp produzidas ($x = 0, 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5), e respectivo desvio padrão, em comparação com as células de controlo (C-).

5. Conclusões e Trabalho Futuro

Partindo do princípio que a hipertermia magnética é um complemento eficaz ao tratamento do cancro, este processo consegue provocar a morte das células cancerígenas através da geração de calor ($\sim 43^{\circ}\text{C}$) por parte de nanopartículas magnéticas. Este aquecimento ocorre quando as nanopartículas, além de biocompatíveis, possuem propriedades exclusivas de superparamagnetismo e são submetidas a um campo magnético externo alternado.

Além de eliminar o tumor maligno, é possível desenvolver partículas com a capacidade de regenerar o tecido ósseo através da presença de hidroxiapatite (HAp). Este fosfato de cálcio está inserido na parte mineral do osso humano, apresentando propriedades de bioatividade. O principal objetivo da presente dissertação baseou-se em desenvolver e caracterizar nanopartículas de HAp pura e dopada com diferentes quantidades de íons Fe^{3+} e avaliar a sua aplicabilidade em hipertermia magnética.

As amostras produzidas via sol-gel com a fórmula química $(\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com $x = 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3$ e 5 , provaram ter um comportamento dependente da temperatura de sinterização e da quantidade de Fe incorporado na estrutura da HAp.

As técnicas de caracterização realizadas revelaram que as partículas de tamanho nanométrico ($\sim 30\text{ nm}$) desenvolvidas possuem um limite de solubilidade de $x = 1$, pois acima desta quantidade de Fe inserida na estrutura da HAp houve a deteção de fases secundárias, como hematite e cloroapatite. A análise de DRX sugeriu que apenas existe dopagem da estrutura para $x \leq 1$, aparecendo o fosfato de cálcio β -TCP a uma temperatura de sinterização de 800°C . A variedade de alterações relatadas nos parâmetros de rede com a inserção de Fe na rede da HAp pode estar associada aos parâmetros de síntese de todas as amostras, bem como à capacidade de análise dos difratogramas obtidos. A mínima variação na síntese pode causar grandes diferenças nos valores dos parâmetros de rede calculados [14].

Em adição, os ensaios de hipertermia magnética realizados *in vitro* concluíram que as quantidades de Fe incorporadas na estrutura da HAp não são suficientes para atingir a temperatura necessária à redução do tumor ósseo. No entanto, os resultados de magnetização

sugerem que as NPs estudadas têm potencialidade na medida em que possuem comportamento superparamagnético. Segundo Hou *et al.* [35] é esperada a aplicação futura de HAp magnética na oncologia humana. Para isso é necessário um estudo mais aprofundado para comprovar a sua segurança e eficácia no corpo humano.

É de frisar que as publicações acerca da produção e sinterização da hidroxiapatite e β -fosfato de tricálcio relatam variações no comportamento e propriedades dos materiais de acordo com o método de síntese. Uma variação dos parâmetros experimentais pode gerar modificações drásticas na composição do produto final (tamanho de partícula, cristalinidade, morfologia, etc).

Algumas ideias de trabalho a desenvolver no futuro poderão ser:

- Usar o precursor de sulfato de ferro, em vez de cloreto de ferro, já que o ião sulfato é mais volumoso na estrutura de HAp, evitando a substituição do grupo hidroxilo.
- Sinterizar as amostras sob atmosfera de azoto, tal como Low *et al.* [43]. A sinterização ao ar é inapropriada na medida em que pode desenvolver uma mistura de apatite com hematite (Fe_2O_3) a partir do oxigénio atmosférico.
- Fazer uma análise cristalográfica para a compreensão das estruturas cristalinas e o fenómeno de difração de raios-X através da análise de *Rietveld*. No entanto, é um estudo muito complexo, tornando-se difícil determinar a localização exata de todos os átomos num cristal.
- Usar a espectroscopia de Mössbauer como técnica complementar à identificação de espécies químicas.
- Aumentar a consistência das pastilhas das amostras de modo a realizar novamente os testes de bioatividade sem que estas fiquem quebradiças.

Em suma, embora as NPMs produzidas de HAp dopada com Fe^{3+} não tenham tido resultados positivos na aplicação em hipertermia magnética, estas mostraram que possuem grande potencialidade em outras áreas como em imagem médica, libertação de fármacos, entre outras, devido às suas propriedades e características.

Referências Bibliográficas

- [1] A. C. Society, "What are the key statistics about bone cancer?," 2017. [Online]. Available: <http://www.cancer.org/cancer/bonecancer/detailedguide/bone-cancer-key-statistics>. [Accessed: 17-Jun-2017].
- [2] National Cancer Institute, "Bone Cancer - National Cancer Institute," 2008. [Online]. Available: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/bone>. [Accessed: 17-Jun-2017].
- [3] A. Chichel, J. Skowronek, M. Kubaszewska, *et al.*, "Hyperthermia - description of a method and a review of clinical applications," *Reports Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 12, no. 5, pp. 267–275, Sep. 2007.
- [4] J. Rivas, M. Bañobre-López, Y. Piñeiro-Redondo, *et al.*, "Magnetic nanoparticles for application in cancer therapy," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 324, pp. 3499–3502, 2012.
- [5] A. Ito and T. Kobayashi, "Intracellular Hyperthermia Using Magnetic Nanoparticles: A Novel Method for Hyperthermia Clinical Applications," *Japanese Soc. Therm. Med.*, 2008.
- [6] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic II, and S. Jin, "Magnetic nanoparticles for theragnostics," *Natl. Institutes Heal.*, vol. 61, no. 6, pp. 467–477, 2009.
- [7] S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, *et al.*, "Magnetic Hydroxyapatite Bone Substitutes to Enhance Tissue Regeneration: Evaluation In Vitro Using Osteoblast-Like Cells and In Vivo in a Bone Defect," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. e38710, Jun. 2012.
- [8] S. V. Dorozhkin, *Calcium orthophosphate-based bioceramics and biocomposites*, 1st ed. Germany: Wiley-VCH, 2016.
- [9] M. H. Fathi, A. Hanifi, and V. Mortazavi, "Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 202, pp. 536–542, 2008.
- [10] A. Russo, M. Bianchi, M. Sartori, *et al.*, "Bone regeneration in a rabbit critical femoral defect by means of magnetic hydroxyapatite macroporous scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, Feb. 2017.
- [11] M. Šupová, "Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 8, pp. 9203–9231, Sep. 2015.
- [12] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, *et al.*, "Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?," *Mater. Today*, vol. 19, no. 2, pp. 69–87, 2016.
- [13] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, *et al.*, "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures," *Acta Biomater.*, vol. 9, pp. 7591–7621, 2013.
- [14] A. Kyriacou, T. Leventouri, B. C. Chakoumakos, *et al.*, "Combined X-ray and neutron diffraction Rietveld refinement in iron-substituted nano-hydroxyapatite," *J. Mater.*

- Sci., vol. 48, no. 9, pp. 3535–3545, 2013.
- [15] M. Jiang, J. Terra, A. M. Rossi, *et al.*, “Fe²⁺/Fe³⁺ substitution in hydroxyapatite: Theory and experiment,” *Am. Phys. Soc.*, vol. 66, p. 224107, 2002.
 - [16] T. Batista and J. Santos-Filho, *Hidroxiapatita e β -Fosfato Tricálcio como absorvedores do ultravioleta*, 1st ed. Sergipe: Instituto Federal de Sergipe, 2016.
 - [17] G. G. Walmsley, A. Mcardle, R. Tevlin, *et al.*, “Nanotechnology in bone tissue engineering,” vol. 11, no. 5, pp. 1253–1263, 2015.
 - [18] H. Zhou and J. Lee, “Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 7, pp. 2769–2781, 2011.
 - [19] F. Sun, H. Zhou, and J. Lee, “Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 7, pp. 3813–3828, 2011.
 - [20] Y.-H. Tseng, C.-S. Kuo, Y.-Y. Li, *et al.*, “Polymer-assisted synthesis of hydroxyapatite nanoparticle,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, pp. 819–822, 2008.
 - [21] Y. Li, C. T. Nam, and C. P. Ooi, “Iron(III) and manganese(II) substituted hydroxyapatite nanoparticles: characterization and cytotoxicity analysis,” *J. Phys. Conf. Ser.* 187, 2009.
 - [22] P. Gentile, C. Wilcock, C. Miller, *et al.*, “Process Optimisation to Control the Physico-Chemical Characteristics of Biomimetic Nanoscale Hydroxyapatites Prepared Using Wet Chemical Precipitation,” *Materials (Basel)*, vol. 8, no. 5, pp. 2297–2310, Apr. 2015.
 - [23] W. Feng, L. Mu-sen, L. Yu-peng, *et al.*, “A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders,” *Mater. Lett.*, vol. 59, no. 8–9, pp. 916–919, Apr. 2005.
 - [24] P. Franco, “Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação,” FCT-UNL, 2009.
 - [25] K. Agrawal, G. Singh, D. Puri, *et al.*, “Synthesis and characterization of hydroxyapatite powder by sol-gel method for biomedical application,” *J. Miner. Mater.*, vol. 10, no. 8, pp. 727–734, 2011.
 - [26] T. A. Kuriakose, S. N. Kalkura, M. Palanichamy, *et al.*, “Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature,” *J. Cryst. Growth*, vol. 263, no. 1–4, pp. 517–523, Mar. 2004.
 - [27] CENTEXBEL, “Solgel treatment | Centexbel.” [Online]. Available: <http://www.centexbel.be/solgel-treatment>. [Accessed: 06-Jul-2017].
 - [28] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, *et al.*, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” *J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. 36, no. 3, pp. 167–181, 2003.
 - [29] S. H. Huang and R. S. Juang, “Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: A review,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 10, pp. 4411–4430, 2011.
 - [30] G. Unsoy, U. Gunduz, O. Oprea, *et al.*, “Magnetite: From synthesis to applications,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15, no. 16, pp. 1622–1640, 2015.
 - [31] E. Francisquini, J. Schoenmaker, and J. A. Souza, “Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações,” in *Química Supramolecular e Nanotecnologia*, 1st ed., W. A. Alves, Ed. São Paulo: Atheneu, 2014, pp. 269–288.

- [32] M. Faraji, Y. Yamini, and M. Rezaee, "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications," *Iran. Chem. Soc.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–37, 2010.
- [33] A. E. Deatsch and B. A. Evans, "Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 354, pp. 163–172, Mar. 2014.
- [34] N. M. Sundaram and S. Murugesan, "Preparation and characterization of an iron oxide-hydroxyapatite nanocomposite for potential bone cancer therapy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, no. Supplement 1 Challenges in biomaterials research, p. 99, Oct. 2015.
- [35] C.-H. Hou, S.-M. Hou, Y.-S. Hsueh, *et al.*, "The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 3956–3960, 2009.
- [36] G. Renaudin, S. Gomes, and J.-M. Nedelec, "First-Row Transition Metal Doping in Calcium Phosphate Bioceramics: A Detailed Crystallographic Study," *Materials (Basel)*, vol. 10, no. 1, p. 92, Jan. 2017.
- [37] A. Gozalian, A. Behnamghader, M. Daliri, *et al.*, "Synthesis and thermal behavior of Mg-doped calcium phosphate nanopowders via the sol gel method," *Sci. Iran.*, vol. 18, no. 6, pp. 1614–1622, Dec. 2011.
- [38] R. Morrissey, L. M. Rodríguez-Lorenzo, and K. A. Gross, "Influence of ferrous iron incorporation on the structure of hydroxyapatite," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 5, pp. 387–392, May 2005.
- [39] S. Gomes, A. Kaur, J.-M. Grenèche, *et al.*, "Atomic scale modeling of iron-doped biphasic calcium phosphate bioceramics," *Acta Biomater.*, vol. 50, pp. 78–88, 2017.
- [40] J. Trinkunaite-Felsen, A. Prichodko, M. Semasko, *et al.*, "Synthesis and characterization of iron-doped/substituted calcium hydroxyapatite from seashells *Macoma balthica* (L.)," *Adv. Powder Technol.*, vol. 26, no. 5, pp. 1287–1293, Sep. 2015.
- [41] O. Kaygili, S. V Dorozhkin, T. Ates, *et al.*, "Dielectric properties of Fe doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method," *Ceram. Int.*, vol. 40, pp. 9395–9402, 2014.
- [42] W. Pon-On, S. Meejoo, and I.-M. Tang, "Substitution of manganese and iron into hydroxyapatite: Core/shell nanoparticles," *Mater. Res. Bull.*, vol. 43, no. 8–9, pp. 2137–2144, Aug. 2008.
- [43] H. R. Low, N. Phonthammachai, A. Maignan, *et al.*, "The Crystal Chemistry of Ferric Oxyhydroxyapatite," *Inorg. Chem.*, vol. 47, no. 24, pp. 11774–11782, Dec. 2008.
- [44] V. S. Chandra, G. Baskar, R. V Suganthi, *et al.*, "Blood Compatibility of Iron-Doped Nanosize Hydroxyapatite and Its Drug Release," *Am. Chem. Soc.*, vol. 4, pp. 1200–1210, 2012.
- [45] K. M. T. Ereiba, A. G. Mostafa, G. A. Gamal, *et al.*, "In Vitro Study of Iron Doped Hydroxyapatite," *J. Eng. Comput. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 131–144, Jul. 2013.
- [46] H.-C. Wu, T.-W. Wang, J.-S. Sun, *et al.*, "A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite," *Nanotechnology*, vol. 18, no. 16, p. 165601, 2007.
- [47] A. Tampieri, T. D'Alessandro, M. Sandri, *et al.*, "Intrinsic magnetism and

- hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 2, pp. 843–851, Feb. 2012.
- [48] S. Gomes, J.-M. Nedelec, E. Jallot, *et al.*, "Unexpected Mechanism of Zn ²⁺ Insertion in Calcium Phosphate Bioceramics," *Chem. Mater.*, vol. 23, no. 12, pp. 3072–3085, Jun. 2011.
- [49] Sigma, "Fundamental Techniques in Cell Culture," *SIGMA Lab.*, pp. 1–61, 2008.
- [50] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, *et al.*, *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- [51] F. Miyaji, Y. Kono, and Y. Suyama, "Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite," *Mater. Res. Bull.*, vol. 40, pp. 209–220, 2004.
- [52] T. A. Ring, *Fundamentals of ceramic powder processing and synthesis*. San Diego: Academic Press, 1996.
- [53] Robert F. Butler, "FERROMAGNETIC MINERALS," in *Paleomagnetism: Magnetic Domains to Geologic Terranes*, Electronic Edition, Ed. Arizona: Blackwell Scientific Publications, 1998, pp. 16–30.



A. Apêndices

A.1. Parâmetros de rede

Tabela A.1: Parâmetros de rede a e c das amostras de HAp pura ($x = 0$) e dopada com Fe^{3+} ($x = 0,25; 0,5$ e 1) para cada temperatura de sinterização

		$x = 0$	$x = 0,25$	$x = 0,5$	$x = 1$
600°C	a (nm)	0,9387	0,9359	0,9443	0,9471
	c (nm)	0,6846	0,6820	0,6906	0,6890
700°C	a (nm)	0,9368	0,9379	0,9387	0,9443
	c (nm)	0,6836	0,6854	0,6864	0,6862
800°C	a (nm)	0,9387	0,9387	0,9462	0,9507
	c (nm)	0,6854	0,6862	0,6862	0,6828

A.2. Magnetômetro de amostra vibrante

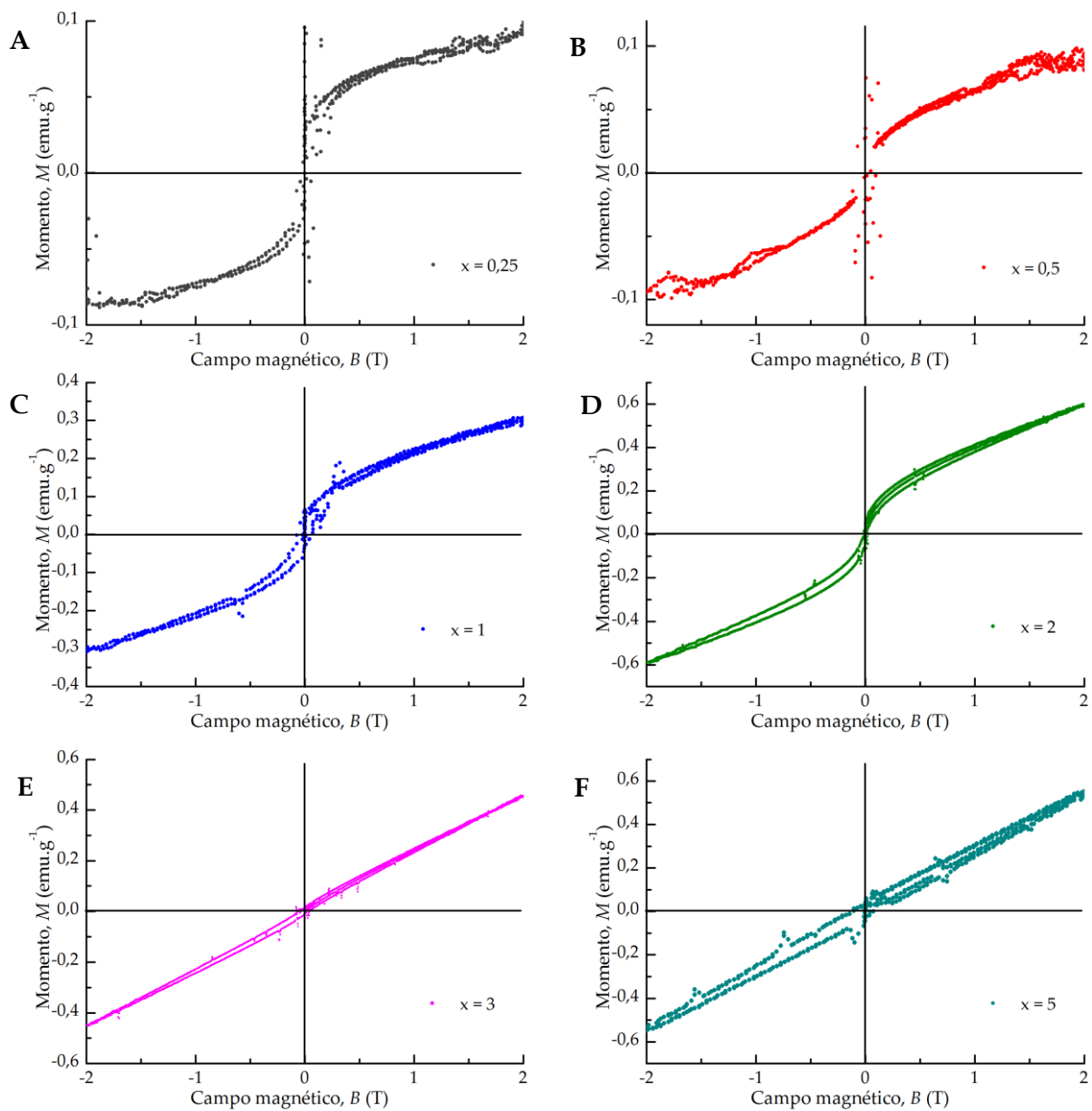


Figura A.1: Curvas de magnetização das amostras com $x = 0,25$ (A), $x = 0,5$ (B), $x = 1$ (C), $x = 2$ (D), $x = 3$ (E), $x = 5$ (F) a 300 K.